

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1956984 B

(45) 授权公告日 2010.06.09

(21) 申请号 200580017003.5

A61P 3/10(2006.01)

(22) 申请日 2005.03.30

A61P 3/06(2006.01)

(30) 优先权数据

60/558,420 2004.04.01 US

(56) 对比文件

WO 0078313 A, 2000.12.28, 全文.

S. S. KULKARNI ET AL. Three-

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.11.27

Dimensional Quantitative Structure

Activity Relationship(3-D-QSAR) of

Antihyperglycemic Agents. BIOOGE. MED.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/010855 2005.03.30

CHEM7. 1999, 71475-1485.

(87) PCT申请的公布数据

W02005/097763 EN 2005.10.20

审查员 于海江

(73) 专利权人 安万特药物公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·G·麦加里 J·格利策 S·凯尔

K·尚德罗斯 J·梅里尔

W·文德勒

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07D 417/12(2006.01)

C07D 413/12(2006.01)

A61K 31/4245(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 29 页

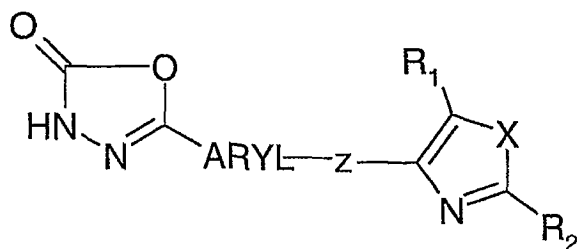
(54) 发明名称

1,3,4-噁二唑-2-酮作为 PPAR- δ 调节剂

(57) 摘要

本发明涉及 1,3,4-噁二唑酮化合物及其药学上可接受的盐、立体异构体、互变异构体或溶剂化物。本发明的化合物为 PPAR- δ 的调节剂,因此用作药剂,尤其用于治疗脱髓鞘疾病以及脂肪酸代谢和葡萄糖利用的紊乱。

1. 式 I 的化合物或其药学上可接受的盐,



I

其中

ARYL 为苯基;

Z 为 $-(CH_2)_n-CO-$, n 独立地是 1 到 5 的整数;

X 为 S;

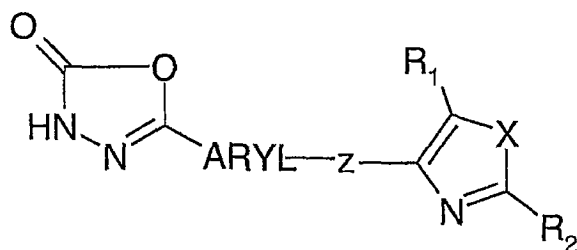
R₁ 为 C₁₋₆ 烷基;以及

R₂ 为取代的或未取代的苯基,其中取代基选自 C₁₋₆ 全氟烷基。

2. 化合物,其是 5-(4-{2-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基]-乙氧基}-苯基)-3H-[1,3,4]噁二唑-2-酮。

3. 药物组合物,其包含有效量的根据权利要求 1 的化合物和药学上可接受的载体。

4. 式 I 的化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗哺乳动物中疾病的药物中的用途,其中该疾病能够为 PPAR- δ 配体结合活性所调节,



I

其中

ARYL 为苯基;

Z 为 $-(CH_2)_n-CO-$;

X 为 S;

R₁ 为 C₁₋₆ 烷基;以及

R₂ 为取代的或未取代的苯基,其中取代基选自 C₁₋₆ 全氟烷基。

5. 根据权利要求 4 的用途,其中 R₂ 为苯基。

6. 根据权利要求 4 的用途,其中所述疾病为选自以下疾病的脱髓鞘疾病:多发性硬化、进行性神经性腓骨肌萎缩、佩-梅病、脑脊髓炎、视神经脊髓炎、肾上腺脑白质营养不良、吉-巴综合征以及形成髓鞘质的神经胶质细胞受到损害的疾病,包括脊髓损伤、神经病和神经损伤。

7. 根据权利要求 6 的用途,其中所述脱髓鞘疾病为多发性硬化。

8. 根据权利要求 4 的用途,其中所述疾病选自以下一组疾病:肥胖症、高甘油三酯血症、高脂血症、低 α 脂蛋白血症、高胆固醇血症、血脂障碍、X 综合征、II 型糖尿病及其选自

以下一组疾病的并发症：神经病、肾病、视网膜病、白内障、高胰岛素血症、葡萄糖耐量异常、胰岛素耐受性、动脉粥样硬化、高血压、冠心病、外周血管病或充血性心力衰竭。

1,3,4-噁二唑-2-酮作为 PPAR- δ 调节剂

发明领域

[0001] 本发明涉及可作为选择性 PPAR- δ 配体受体结合剂的新颖化合物和药物制剂,其用于调节 PPAR- δ 受体以治疗由核激素受体介导的疾病。本发明的 PPAR- δ 配体受体结合剂可用作 PPAR- δ 受体的激动剂或拮抗剂。

[0002] 发明背景

[0003] 过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 包含核受体超家族的一个亚家族。现已鉴定和克隆了四种密切相关的同工型,通常称为 PPAR- α 、PPAR- γ -1、PPAR- γ -2 和 PPAR- δ 。每个受体亚型具有一个特征性的 DNA 结合区 (DBD) 和一个配体结合区 (LBD),两者对于配体激活的基因表达来说都是必要的。PPAR 以异二聚体与类视黄醇 X 受体结合。参见 J. Berger and D. E. Miller, *Annu. Rev. Med.*, 2002, 53, 409-435。

[0004] PPAR- δ (亦称为 PPAR- β) 在广泛的哺乳动物组织中表达,但是,关于其生物功能或该受体所调节的全部基因却很少有阐述。不过,最近发现,激动剂可用于治疗诸如血脂障碍和某些皮肤疾病,而拮抗剂可用于治疗骨质疏松症或结肠直肠癌 (D. Sternbach, in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Volume 38, A. M. Doherty, ed., Elsevier Academic Press, 2003 pp. 71-80)。

[0005] PPAR- δ 似乎在 CNS 中有相当的表达;但是,其大多数功能尚待发现。不过,特别重要的是发现 PPAR- δ 在啮齿类少突胶质细胞中表达,少突胶质细胞是 CNS 的主要产脂类细胞 (J. Granneman, et al., *J. Neurosci. Res.*, 1998, 51, 563-573)。此外还发现,PPAR- δ 选择性激动剂能够显著增加小鼠培养物中少突胶质细胞髓鞘质基因的表达,并能够增加髓鞘直径 (I. Saluja et al., *Glia*, 2001, 33, 194-204)。因此,PPAR- δ 活化剂可以对治疗脱髓鞘和髓鞘形成障碍疾病有用。

[0006] 脱髓鞘疾病表现为髓鞘质,即覆盖很多神经纤维的脂质和蛋白质的多重稠密外层的丢失。这些外层是由中枢神经系统 (CNS) 的少突神经胶质和外周神经系统 (PNS) 的施旺细胞提供的。对具有脱髓鞘状况的患者来说,脱髓鞘可以是不可逆的;脱髓鞘通常伴有或随后会发生轴突退化,通常还出现细胞退化。脱髓鞘可因神经元损害或髓鞘质本身受到损害而发生—无论是由于异常免疫反应、局部损伤、局部缺血、代谢紊乱、毒性物质,还是病毒感染所引起。(Prineas and McDonald, *Demyelinating Diseases* (脱髓鞘疾病). In *Greenfield's Neuropathology*, 6. sup. th ed. (Edward Arnold: New York, 1997) 813-811, Beers and Berkow, eds., *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (默克诊断治疗手册), 17. sup. thed. (Whitehouse Station, N. J.: Merck Research Laboratories, 1999) 1299, 1437, 1473-76, 1483)。

[0007] 中央脱髓鞘 (中枢神经系统脱髓鞘) 在多种疾病中均会发生,通常病因不明,这些疾病已经成为主要的脱髓鞘疾病。在这些疾病中,多发性硬化症最为普遍。其它主要的脱髓鞘疾病包括肾上腺脑白质营养不良 (ALD)、肾上腺脊髓神经病、艾滋病—空泡性脊髓病、HTLV 相关的脊髓病、莱伯遗传性视神经萎缩、进行性多灶性脑白质病 (PML)、亚急性硬化性全脑炎、吉—巴综合征和热带痉挛性轻截瘫。此外,还有一些急性病症可以出现中枢神经系

统脱髓鞘,如急性播散性脑脊髓炎(ADEM)和急性病毒性脑炎。另外,急性横贯性脊髓炎也可以导致脱髓鞘,急性横贯性脊髓炎是综合征,其中未知原因的急性脊髓横切影响到一个或多个胸节中的灰质和白质。还有一些形成髓鞘质的神经胶质细胞受到损害的疾病,包括脊髓损伤、神经病和神经损伤。

[0008] 选择性 PPAR- δ 调节剂对治疗或防止其他疾病状态可以也有用,参见 Joel Berger et al., Annu. Rev. Med. 2002, 53, 409-435; Timothy Wilson et al. J. Med. Chem., 2000, Vol. 43, No. 4, 527-550; Steven Kliewer et al., Recent Prog Horm Res. 2001; 56: 239-63; Jean-Charles Fruchart, BartStaels and Patrick Duriez: PPARs, Metabolic Disease and Arteriosclerosis(代谢疾病和动脉粥样硬化), Pharmacological Research, Vol. 44, No. 5, 345-52; 2001; Sander Kersten, Beatrice Desvergne & Walter Wahli: Roles of PPARs in health and disease(PPAR 在健康和疾病中的作用), Nature, vol 405, 25 May 2000; 421-4; Ines Pineda Torra, Giulia Chinetti, Caroline Duval, Jean-Charles Fruchart and BartStaels: Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice(过氧化物酶体增殖物激活受体:从转录控制到临床实践), Curr Opin Lipidol 12:2001, 245-254)。

[0009] 起 PPAR- δ 调节剂作用的化合物对于脂肪酸代谢疾病和涉及胰岛素耐受性的葡萄糖利用紊乱的治疗和/或预防可以特别适合。

[0010] 糖尿病,尤其是 2 型糖尿病,包括其后遗症的预防。有关这一点的特殊方面是高血糖症、胰岛素耐受性的改善、葡萄糖耐受性的改善、胰腺 β 细胞的保护以及血管和微血管疾病的预防等。

[0011] 血脂障碍及其后遗症如动脉粥样硬化、冠心病、脑血管疾病等,尤其是那些(但不限于)以下述或多种因素为特征性疾病:高血浆甘油三酯浓度、餐后高血浆甘油三酯浓度、低 HDL 胆固醇浓度、低 ApoA 脂蛋白浓度、高 LDL 胆固醇浓度、小密度 LDL 胆固醇颗粒以及高 ApoB 脂蛋白浓度。

[0012] 其他与这一代谢综合征有关的各种疾病有:肥胖症(体重过高),包括中部肥胖、血栓形成、高凝结和趋血栓阻塞状态(动脉和静脉)、高血压、心力衰竭,例如(但不限于)心肌梗塞、高血压性心脏病或心肌症后出现的心力衰竭。

[0013] 其他可以涉及炎症反应或细胞分化的紊乱和状况有:动脉粥样硬化,例如(但不限于)冠状动脉硬化,包括心绞痛或心肌梗塞、中风、血管再狭窄或再闭塞,慢性炎症肠病,如克隆症和溃疡性结肠炎、胰腺炎、其他炎症状态、视网膜病、脂肪细胞瘤、脂肪瘤样癌,如脂肪肉瘤、实体瘤和赘生物,例如(但不限于)胃肠道癌、肝癌、胆道癌和胰腺癌、内分泌腺瘤、肺癌、肾和尿道癌、生殖道癌、前列腺癌等、急性和慢性骨髓增生性疾病以及淋巴瘤血管生成、神经变性疾病、阿尔茨海默氏病、帕金森病、红斑鳞屑性皮肤病,例如牛皮癣和普通痤疮。

[0014] PPAR- δ 调节的其他皮肤病和皮肤状况有:

[0015] 湿疹、神经性皮炎、皮炎,例如脂溢性皮炎或日光性皮炎、角膜炎和角化病,例如脂溢性角化病、老年角化病、光化性角化病、光致角化病或角化病引起的毛囊角化病瘢痕瘤和瘢痕瘤的预防、疣,包括湿疣或尖锐湿疣、人乳头瘤病毒(HPV)感染,例如性病乳头瘤、病毒性疣,例如传染性软疣、白斑丘疹性皮肤病,例如扁平苔癣、皮肤癌,例如基底细胞癌、黑色素瘤

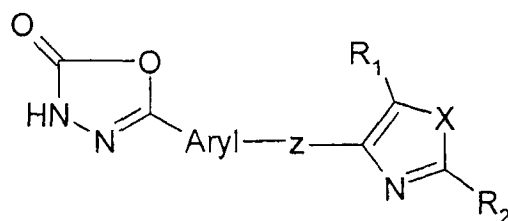
或皮肤 T 细胞淋巴瘤、局部良性表皮瘤,例如,角皮病、表皮痣和冻疮。

[0016] PPAR- δ 可以调节的各种其他状况包括 X 综合征、多囊性卵巢综合征 (PCOS)、哮喘性骨关节炎、红斑狼疮 (LE) 或炎性风湿病,例如类风湿性关节炎、脉管炎、消耗性疾病 (恶病质)、痛风性局部缺血 / 再灌注综合征以及急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。

[0017] 发明概述

[0018] 本发明涉及式 I 的化合物或其立体异构体、互变异构体或溶剂化物或其药学上可接受的盐,

[0019]



I

[0020] 其中

[0021] ARYL (芳基) 为苯基或吡啶基,其中所述苯基或吡啶基任选地为选自以下基团的一个或多个取代基所取代:卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基、 C_{1-6} 烷硫基、羟基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 酰氧基、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基以及 C_{1-6} 烷氧羰基;

[0022] Z 为 $-O(CH_2)_n-$ 、 $-SO_2(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-CO-$ 、 $-O(CH_2)_n-CO-$

[0023] 或 $-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-CO-$,其中 Y 为 NR_3 、O 或 S, R_3 选自 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 烷基 C_{3-8} 环烷基和苯甲基, n 独立地是 1 到 5 的整数;

[0024] X 为 NR_3 、O 或 S,其中 R_3 如上面所定义;

[0025] R_1 为 H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基;羟基 C_{1-6} 烷基、硝基、氰基和 C_{1-6} 烷基氨基;以及

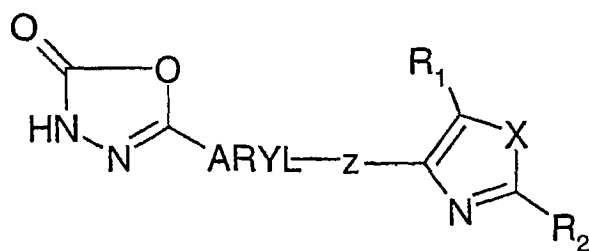
[0026] R_2 为取代的或未取代的苯基、吡啶基或噻吩基,其中取代基选自以下一组基团:卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基、 C_{1-6} 烷硫基、羟基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 酰氧基、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基和 C_{1-6} 烷氧羰基;

[0027] 条件是当 Z 为 $-O(CH_2)_n-$ 或 $-SO_2(CH_2)_n-$,并且 ARYL 为苯基时, R_2 不为苯基。

[0028] 本发明还涉及式 I 化合物的药物组合物,以及通过对需要调节的受试者施用优先调节 PPAR- δ 活性的化合物,使用所述化合物和组合物调节 PPAR- δ 的方法。

[0029] 本发明的另一方面公开了治疗哺乳动物中疾病的方法,其中该疾病能够为 PPAR- δ 配体结合活性所调节,所述方法包括对患有所述疾病的所述哺乳动物施用治疗有效量的式 I 的化合物或其立体异构体、互变异构体或溶剂化物或其药学上可接受的盐,

[0030]



I

[0031] 其中

[0032] ARYL 为苯基或吡啶基,其中所述苯基或吡啶基任选地为选自以下基团的一个或多个取代基所取代:卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基、 C_{1-6} 烷硫基、羟基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 酰氧基、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基以及 C_{1-6} 烷氧羰基;

[0033] Z 为 $-O(CH_2)_n-$ 、 $-SO_2(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-CO-$ 、 $-O(CH_2)_n-CO-$

[0034] 或 $-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-CO-$,其中 Y 为 NR_3 、O 或 S, R_3 选自 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 烷基 C_{3-8} 环烷基和苯甲基, n 独立地是 1 到 5 的整数;

[0035] X 为 NR_3 、O 或 S,其中 R_3 如上面所定义;

[0036] R_1 为 H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基;羟基 C_{1-6} 烷基、硝基、氰基和 C_{1-6} 烷基氨基;以及

[0037] R_2 为取代的或未取代的苯基、吡啶基或噻吩基,其中取代基选自以下一组基团:卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基、 C_{1-6} 烷硫基、羟基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 酰氧基、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基和 C_{1-6} 烷氧羰基。

[0038] 发明详述

[0039] 本文中所用术语具有以下含义:

[0040] 本文中所用的“ C_{1-6} 烷基”这一表述包括甲基和乙基基团,以及直链或支链的丙基、丁基、戊基和己基基团。特定烷基是甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。派生的表述如“ C_{1-6} 烷氧基”、“ C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基”、“羟基 C_{1-6} 烷基”、“ C_{1-6} 烷基羰基”、“ C_{1-6} 烷氧基羰基 C_{1-6} 烷基”、“ C_{1-6} 烷氧基羰基”、“氨基 C_{1-6} 烷基”、“ C_{1-6} 烷基氨基甲酰基 C_{1-6} 烷基”、“ C_{1-6} 二烷基氨基甲酰基 C_{1-6} 烷基”、“单-或双- C_{1-6} 烷基氨基 C_{1-6} 烷基”、“氨基 C_{1-6} 烷基羰基”、“二苯基 C_{1-6} 烷基”、“芳基 C_{1-6} 烷基”、“芳基羰基 C_{1-6} 烷基”以及“芳氧基 C_{1-6} 烷基”也应予相应地理解。

[0041] 本文中所用的“ C_{2-6} 烯基”这一表述包括乙烯基和直链或支链的丙烯基、丁烯基、戊烯基和己烯基。类似地,“ C_{2-6} 炔基”这一表述包括乙炔基和丙炔基,以及直链或支链的丁炔基、戊炔基和己炔基。

[0042] 本文所用的术语“ C_{1-4} 酰氧基”表示连接到氧原子的酰基,一些实例包括但不限于乙酰氧基、丙酰氧基、丁酰氧基、异丁酰氧基、仲丁酰氧基、叔丁酰氧基等等。

[0043] 本文中所用的“芳基”代表碳环芳香环系统,如苯基、联苯基、萘基、蒽基、菲基、芴基、茚基、并环戊二烯基(pentalenyl)、萘基、亚联苯基等等。“芳基”还意在包含上述环碳芳族系统的部分氢化的衍生物。此类部分氢化的衍生物的非限制性实例有 1,2,3,4-四氢萘基和 1,4-二氢萘基等。

[0044] 本文中所用的“芳氧基”代表“ $-O-$ 芳基”基团,其中芳基如上文所定义。

[0045] 本文中所用的“杂芳基”(单独或组合形式,如“杂芳氧基”,或“杂芳基烷基”)为5-10元的芳香环系统,其中一个或多个环包含一个或多个选自N、O或S的杂原子,例如,包括但不限于吡咯、吡唑、呋喃、噻吩、喹啉、异喹啉、喹唑啉基、吡啶、嘧啶、噁唑、噻唑、噻二唑、四唑、三唑、咪唑或苯并咪唑。

[0046] 本文中所用的“杂环或杂环基”(单独或任何组合形式,如杂环基烷基)为饱和或部分未饱和的4-10元的环系统,其中一个或多个环含有一个或多个选自N、O或S的杂原子,例如,包括但不限于吡咯烷、哌啶、哌嗪、吗啉、四氢吡喃或咪唑烷。

[0047] 本文所用的“C₁₋₆全氟烷基”意指所述烷基中所有的氢原子都被氟原子所取代。示例包括三氟甲基和五氟乙基,以及直链或支链七氟丙基、九氟丁基、十一氟戊基和十三氟己基。派生的表达“C₁₋₆全氟烷氧基”也应予相应地理解。

[0048] 本文所用的表达“C₃₋₈环烷基”意指环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0049] 本文所用的表达“C₃₋₈环烷基 C₁₋₆烷基”意指本文所定义的C₃₋₈环烷基被进一步连接到本文所定义的C₁₋₆烷基上。代表性的实例包括环丙基甲基、1-环丁基乙基、2-环戊基丙基、环己基甲基、2-环庚基乙基和2-环辛基丁基等。

[0050] 本文所用的“卤素”或“卤”意指氯、氟、溴和碘。

[0051] 本文所用的“C₁₋₆烷基磺酰基”代表“—S(=O)₂C₁₋₆烷基”基团,其中C₁₋₆烷基如上文所定义。代表性的实例包括但不限于甲磺酰基、乙磺酰基、正丙磺酰基、异丙磺酰基、丁磺酰基、异丁磺酰基、仲丁磺酰基、叔丁磺酰基、正戊磺酰基、异戊磺酰基、新戊磺酰基、叔戊磺酰基、正己磺酰基、异己磺酰基等。

[0052] 本文所用的“芳基磺酰基”代表“—S(=O)₂芳基”,其中芳基如上文所定义。

[0053] 本文所用的“杂芳基磺酰基”代表“—S(=O)₂杂芳基”基团,其中杂芳基如上文所定义。

[0054] “立体异构体”这一表述为通用术语,用于仅在原子的空间取向上有差别的单个分子的所有异构体。典型情况下,它包括通常由于存在至少一个不对称中心而形成的镜像异构体(对映体)。当本发明的化合物具有两个或更多不对称中心时,它们还可以以非对映异构体存在,另外,有些单个分子还可以以几何异构体(顺式/反式)存在。应当理解,此处的所有此类异构体和任何比例的混合物均包括在本发明所涵盖的范围内。

[0055] “取代的”意为由独立地选自以下一组基团的一个或两个取代基所取代:C₁₋₆烷基、C₁₋₆全氟烷基、羟基、—CO₂H、酯、酰胺、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆全氟烷氧基、—NH₂、Cl、Br、I、F、—NH—低级烷基和—N(低级烷基)₂。

[0056] 本发明的化合物和盐可以以几种互变异构体形式存在,包括烯醇和亚胺形式、酮和烯胺形式,以及几何异构体及其混合物。所有此类互变异构体形式均属于本发明所涵盖的范围。互变异构体在溶液中以互变异构体混合物的形式存在。在固态形式下,通常互变异构体占主导地位。虽然可以对互变异构体进行描述,但本发明包括本发明化合物的所有互变异构体。

[0057] 本文所用的术语“调节剂”指的是具有增强(如“激动”活性)或抑制(如“拮抗”活性)生物活动或过程(如酶活性或受体结合)的功能特性的能力的化合物;此种增强或抑制作用可以视某一特定的事件而定,如信号转导通路的活化或抑制,和/或仅在特殊类

型的细胞中才会出现并可产生可量度的生物变化。

[0058] 本文所用的“患者”意为温血动物，例如大鼠、小鼠、狗、猫、豚鼠，以及灵长类例如人类。

[0059] 本文中所用的“药学上可接受的载体”这一表述意指无毒的溶剂、分散剂、赋形剂、辅剂或其它与本发明的化合物混合以形成药物组合物，即能够施用于患者的剂型的物质。此类载体的一个实例是药学上可接受的油，其典型情况下用于肠胃外施用。

[0060] 本文中所用的术语“药学上可接受的盐”意指本发明的化合物的盐可用于药物制备。但是，其它盐也可以用于制备根据本发明的化合物及其药学上可接受的盐。本发明的化合物之适宜的药学上可接受的盐包括酸加成盐，其可通过混合本发明之化合物的溶液和药学上可接受的酸的溶液来制备，所述酸例如氢氯酸、氢溴酸、硫酸、甲磺酸、2-羟基乙磺酸、对甲苯磺酸、富马酸、马来酸、羟基马来酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、戊二酸、乙酸、水杨酸、肉桂酸、2-苯氧基苯甲酸、羟基苯甲酸、苯乙酸、苯甲酸、草酸、柠檬酸、酒石酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、碳酸或磷酸。酸式金属盐，如磷酸氢二钠和硫酸氢钾也可以制备。另外，按此方法形成的盐可以单酸盐或双酸盐存在，亦可以水合盐或基本上无水的盐存在。此外，当本发明的化合物本身含有酸性部分时，则其适宜的药学上可接受的盐可以包括碱金属盐，如钠盐或钾盐；碱土金属盐，如钙盐或镁盐；以及与适当的有机配体形成的盐，如季铵盐。

[0061] 本文所用的术语“治疗有效量”意指能够有效地治疗所述疾病或状况的本发明化合物的量。

[0062] 本发明还提供了包含或多种本发明化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。这些组合物优选为单位剂型，如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、粒剂、无菌注射液或混悬液、定量气雾剂或液体喷雾剂、滴剂、安瓿剂、自动注射装置或栓剂；用于经口、肠胃外、鼻内、舌下或直肠给药，或用于通过吸入或吹入给药。备选地，药物组合物也可以每周一次或每月一次施用的适当形式提供，如活性化合物的不溶盐，例如癸酸盐可以适于提供肌肉注射的长效制剂。可以设想含有活性成分的易蚀性聚合物。制备固体组合物如片剂时，主要的活性成分与药物载体混合，所述载体为如常用的片剂成分如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶以及其它药物稀释剂，如水，以便形成固态预配制组合物(preformulation Composition)，其包含本发明之化合物或其药学上可接受的盐的均一混合物。当我们说这些预配制组合物为均一时，指的是其活性成分均匀地散布在组合物中，因此，该组合物可被细分为同样有效的单位剂型，如片剂、丸剂和胶囊剂。这一固态预配制组合物后被细分成上述包含 0.1 到大约 500 毫克本发明之活性成分的单位剂型。加味的单位剂型包含 1 到 100 毫克，如 1、2、5、10、25、50 或 100 毫克活性成分。该新颖组合物的片剂或丸剂可加以包衣或复合以便提供一个具有长期作用优势的剂型。例如，片剂或丸剂可包含内剂量和外剂量组分，外剂量组分为内剂量组分的包膜形式。两个组分可由一层肠衣分隔开来，使得内剂量组分在胃里不被分解，从而完整地进入十二指肠或延迟释放。很多材料都可用作这层肠衣或包衣，包括聚合酸和聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素材料的混合物。

[0063] 可包含本发明的新颖组合物以便通过口服或注射给药的液体形式包括水溶液、具有适当口味的糖浆、水性混悬剂或油混悬剂、带有食用油如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生

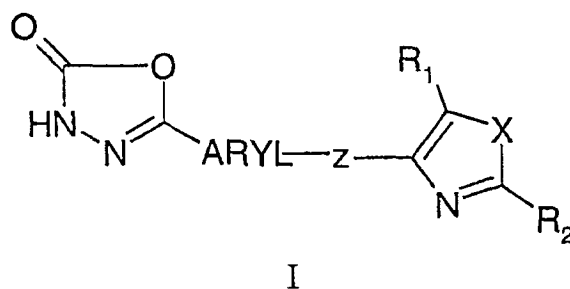
油的加味乳剂,以及酞剂和类似的药物载体。用于水性悬浮液的适当的分散或悬浮剂包括合成和天然树胶如西黄蓍胶、阿拉伯树胶、海藻酸盐、葡聚糖、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯-吡咯烷酮或明胶。

[0064] 在此处所述的各种疾病状态的治疗中,适当的剂量水平为大约 0.01 到 250mg/kg 每日,优选大约 0.05 到 100mg/kg 每日,尤其是 0.05 到 20mg/kg 每日。该化合物的给药方案可为每日 1 到 4 次。

[0065] 在以下实例和制备法中,所用的术语将具有以下含意:“kg”指千克,“g”指克,“mg”指毫克,“ μ g”指微克,“pg”指皮克,“mol”指摩尔,“mmol”指毫摩尔,“ μ mole”指微摩尔,“nmole”指纳摩尔,“L”指升,“mL”或“ml”指毫升,“ μ L”指微升,“ $^{\circ}$ C”指摄氏度,“Rf”指保留因子,“mp”或“m. p.”指熔点,“dec”指分解,“bp”或“b. p.”指沸点,“mm Hg”指以毫米汞柱计的压力,“cm”指厘米,“nm”指纳米,“ $[\alpha]_D^{20}$ ”指在 1 分米比色杯于 20 $^{\circ}$ C 时获得的钠的 D 线的比旋光,“c”指以克/毫升计的浓度,“THF”指四氢呋喃,“DMF”指二甲基甲酰胺,“NMP”指 1-甲基-2-吡咯烷酮,“盐水”指饱和氯化钠水溶液,“M”指摩尔/升,“mM”指毫摩尔/升,“ μ M”指微摩尔/升,“nM”指纳摩尔/升,“TLC”指薄层层析,“HPLC”指高效液相层析,“HRMS”指高分辨率质谱,“CIMS”指化学电离质谱,“ESI”指电喷射电离质谱,“tR”指保留时间,“lb”指磅,“gal”指加仑,“L. O. D.”指干燥失重,“ μ Ci”指微居里,“i. p.”指腹膜内的,“i. v.”指静脉内的。

[0066] 在本发明的一个方面,披露了具有式 I 所示的一般结构的新颖化合物或其立体异构体、互变异构体或溶剂化物或其药学上可接受的盐:

[0067]



[0068] 其中

[0069] ARYL 为苯基或吡啶基,其中所述苯基或吡啶基任选地为选自以下基团的一个或多个取代基所取代:卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基、 C_{1-6} 烷硫基、羟基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 酰氧基、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基以及 C_{1-6} 烷氧羰基;

[0070] Z 为 $-O(CH_2)_n-$ 、 $-SO_2(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-CO-$ 、 $-O(CH_2)_n-CO-$

[0071] 或 $-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-CO-$, 其中 Y 为 NR_3 、O 或 S, R_3 选自 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 烷基 C_{3-8} 环烷基和苯甲基, n 独立地是 1 到 5 的整数;

[0072] X 为 NR_3 、O 或 S, 其中 R_3 如上面所定义;

[0073] R_1 为 H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基;羟基 C_{1-6} 烷基、硝基、氰基和 C_{1-6} 烷基氨基;以及

[0074] R_2 为取代的或未取代的苯基、吡啶基或噻吩基,其中取代基选自以下一组基团:卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基、 C_{1-6} 烷硫基、羟基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 酰

氧基、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基和 C_{1-6} 烷氧羰基；

[0075] 条件是当 Z 为 $-O(CH_2)_n-$ 或 $-SO_2(CH_2)_n-$ ，并且 ARYL 为苯基时， R_2 不为苯基。

[0076] 在该实施方案的另一个方面，披露了化合物，其中 ARYL 是苯基并且 X 是 O 或者 S。

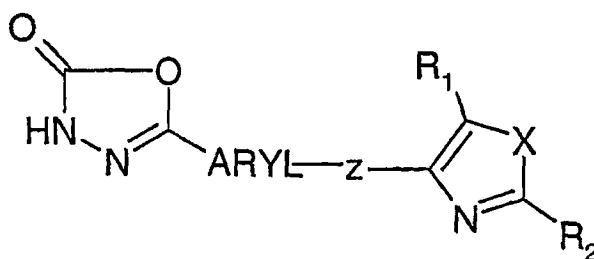
[0077] 在该实施方案的另一个方面，披露了化合物，其中 X 是 O。

[0078] 此实施方案的典型化合物是：5-(4-{2-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基]-乙氧基}-苯基)-3H-[1,3,4] 噁二唑-2-酮。

[0079] 在本发明的另一个实施方案中，披露了包含有效量的式 I 的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0080] 在本发明的另一个实施方案中，披露了治疗哺乳动物的疾病的方法，其中该疾病能够为 PPAR- δ 配体结合活性所调节，该方法包括对患有所述疾病的所述哺乳动物施用治疗有效量的式 I 的化合物或其立体异构体、互变异构体或溶剂化物或其药学上可接受的盐：

[0081]



I

[0082] 其中

[0083] ARYL 为苯基或吡啶基，其中所述苯基或吡啶基任选地为选自以下基团的一个或多个取代基所取代：卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基、 C_{1-6} 烷硫基、羟基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 酰氧基、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基以及 C_{1-6} 烷氧羰基；

[0084] Z 为 $-O(CH_2)_n-$ 、 $-SO_2(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_n-CO-$ 、 $-O(CH_2)_n-CO-$

[0085] 或 $-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-CO-$ ，其中 Y 为 NR_3 、O 或 S， R_3 选自 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 烷基 C_{3-8} 环烷基和苯甲基，n 独立地是 1 到 5 的整数；

[0086] X 为 NR_3 、O 或 S，其中 R_3 如上面所定义；

[0087] R_1 为 H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基；羟基 C_{1-6} 烷基、硝基、氰基和 C_{1-6} 烷基氨基；以及

[0088] R_2 为取代的或未取代的苯基、吡啶基或噻吩基，其中取代基选自以下一组基团：卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 全氟烷基、 C_{1-6} 烷硫基、羟基、羟基 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 酰氧基、硝基、氰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基和 C_{1-6} 烷氧羰基。

[0089] 在本实施方案的另一个方面，披露了化合物，其中 ARYL 是苯基。

[0090] 在本实施方案的另一个方面，披露了化合物，其中 ARYL 是苯基，且 R_2 是苯基。

[0091] 在本实施方案的又一个方面，披露了化合物，其中 ARYL 是苯基，Z 是 $-O(CH_2)_n-$ ，且 R_2 是苯基。

[0092] 在本实施方案的再一个方面，披露了化合物，其中 ARYL 是苯基，Z 是 $-O(CH_2)_n-$ ，X 是 O 或 S，且 R_2 是苯基。

[0093] 在本实施方案的另一个方面,披露了化合物,其中 ARYL 是苯基, Z 是 $-O(CH_2)_n-$, X 是 O 或 S, R_1 是 C_{1-6} 烷基, R_2 是苯基。

[0094] 在本实施方案的又一个方面,披露了化合物,其中 X 是 O。

[0095] 在本实施方案的再一个方面,披露了化合物,其中 X 是 S。

[0096] 在这一实施方案的又一个方面,披露了方法,其中所述疾病为选自以下一组疾病的脱髓鞘疾病:多发性硬化、进行性神经性腓骨肌萎缩、佩-梅病、脑脊髓炎、视神经脊髓炎、肾上腺脑白质营养不良、吉-巴综合征以及形成髓鞘质的神经胶质细胞受到损害的疾病,包括脊髓损伤、神经病和神经损伤。

[0097] 在本实施方案的另一个方面,披露了方法,其中脱髓鞘疾病为多发性硬化。

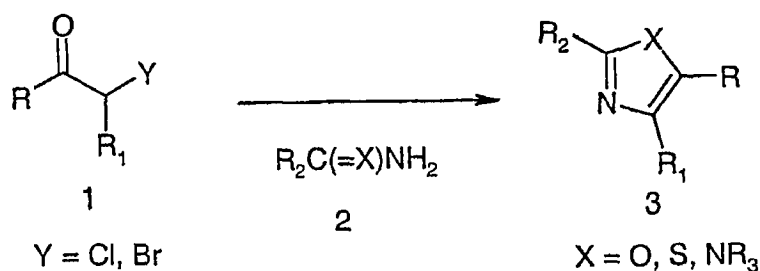
[0098] 在这一实施方案的又一个方面,披露了方法,其中所述疾病选自:肥胖症、高甘油三酯血症、高脂血症、低 α 脂蛋白血症、高胆固醇血症、血脂障碍、X 综合征、II 型糖尿病及其选自以下一组疾病的并发症:神经病、肾病、视网膜病、白内障、高胰岛素血症、葡萄糖耐量异常、胰岛素耐受性、动脉粥样硬化、高血压、冠心病、外周血管病或充血性心力衰竭。

[0099] 本文披露的化合物可按下面方案中的步骤来合成,除另有说明外,其中 ARYL、X、Z 和 R 取代基已在式 I 中注明。如有必要,在下面的合成方案中,本发明中所述化合物中的反应官能团可通过适当的保护基团加以保护。保护基团可在合成的稍后阶段去除。T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley and Sons, 1991 提供了保护反应官能团及其后续的去除方法。

[0100] 方案 A 例示了用于式 I 化合物的适当的咪唑、噁唑或噻唑,中间体的合成方法,其中 X 是 O、S 或 NR_3 。杂环可用化学文献中已知的方法制备(这方面的述评请见 Katritzky, A. R.; Rees, C. W. Eds. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (综合杂环化学), Vol. 5; Pergamon Press (1984); Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, E. F. V. Eds. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Vols 3 & 4, Pergamon Press (1996))。具体来说,所述噁唑、咪唑和噻唑可在 40°C 到 150°C 的温度范围内,通过将适当的 α 卤-酮 1 分别与酰胺、脒、或硫代酰胺(通式 2)稠合从而给出中间体杂环 3 来制备。

[0101] 方案 A

[0102]



[0103] 方案 B 给出了式 I 的化合物的一般合成方法,其中 Z 为 $-O(CH_2)_n-$ 。相应地,在 B1 步骤中,可用方案 A 例示的方法合成的适当取代的羧酸酯 4 通过本领域众所周知的方法还原成醇 5。例如,该还原反应可通过铝氢化物,如氢化锂铝或二异丁基氢化铝在惰性溶液中实现。在步骤 B2 中,化合物 5 中的醇官能团被转化成离去基团,从而生成化合物 6,其中 Lg 是离去基团,如卤素或磺酸酯,如甲磺酸酯或甲苯磺酸酯。转化成离去基团的过程可通过醇与试剂如 N-溴代琥珀酰亚胺在三苯基膦存在的情况下反应生成其中离去基团为溴的化合

物或与亚硫酸二氯反应生成其中离去基团为氯的化合物的反应来完成。如果希望得到磺酸酯,化合物 5 与适当的磺酰氯在适当碱存在的条件下反应则会产生所需的磺酸酯。例如,化合物 5 与甲基磺酰氯在有机碱如三乙胺或吡啶存在的情况下在惰性溶液中反应将生成化合物 6,其中离去基团为 OSO_2CH_3 。

[0104] 在步骤 B3 中,适当取代的羟基芳基酯 7 与杂环 6 反应以置换离去基团而生成偶联酯 8。该置换反应通常在碱,如氢化钠或其他无机碱,如碱性碳酸盐或碱性氢氧化物存在的情况下,在惰性溶剂中进行。反应温度为 0°C 到该惰性溶剂的回流温度,但并非关键因素。

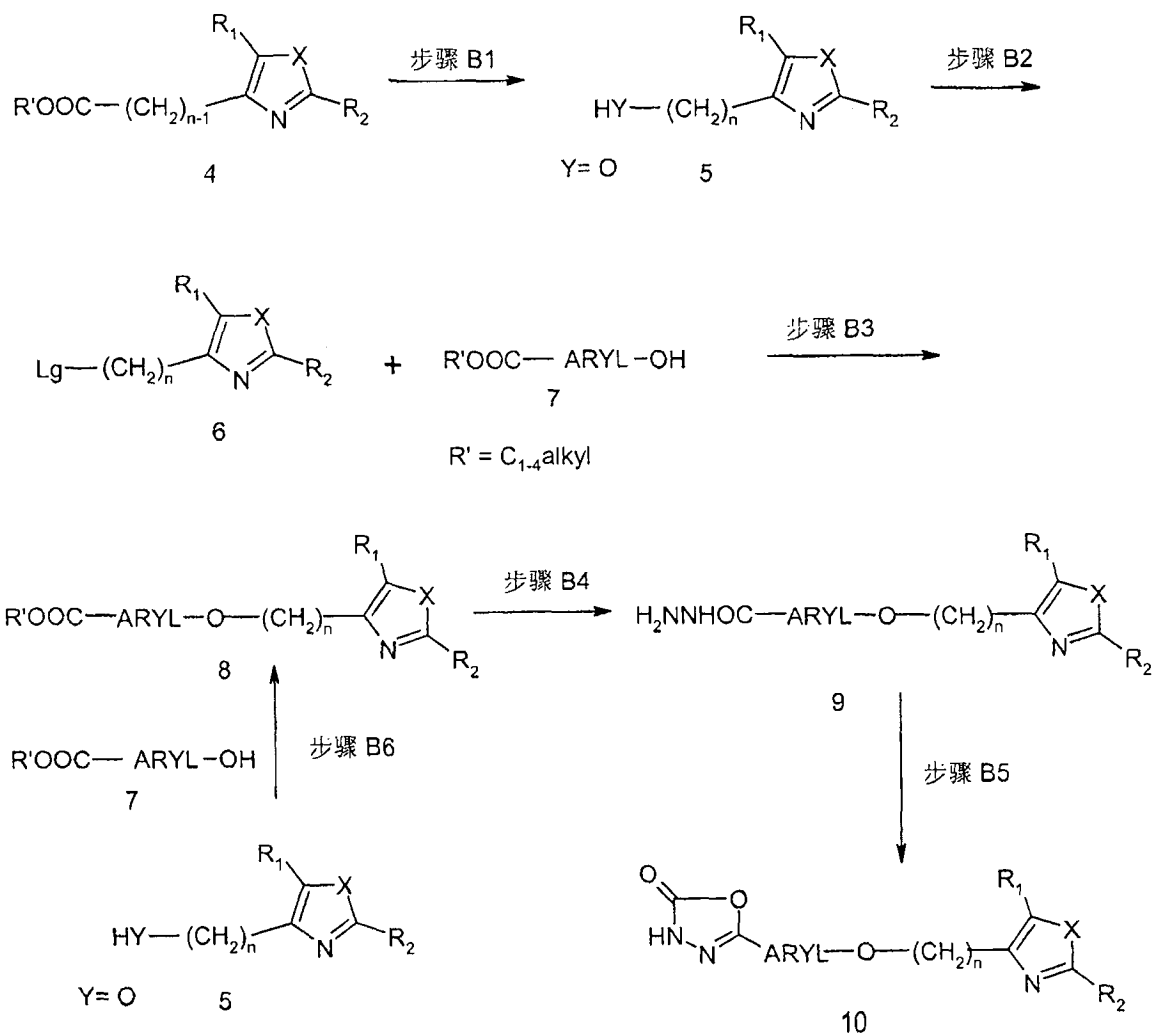
[0105] 步骤 B4 中的化合物 8 然后用纯肼或适当的有机溶剂中的肼处理,以生成酰基肼 9。反应通常在 50°C 到该有机溶剂的回流温度之间的温度进行。

[0106] 步骤 B5 中,酰基肼 9 通过环化作用生成目标化合物 1,3,4-噁二唑-2-酮 10,该环化作用通过用氯甲酸酯在有机碱,如吡啶存在的情况下处理化合物 9,接着在高温密封管中用强受阻胺碱,如 1,8-二氮杂双环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (DBU) 在适当的有机溶剂,如乙腈中进一步处理而实现。典型情况下,该反应的温度为 100°C 到 200°C 。1,3,4-噁二唑-2-酮也可以通过将化合物 9 与光气反应来合成。参见 Stempel, A., et al., J. Org. Chem. 1955, 20, 412。

[0107] 步骤 B6 例示偶联酯 8 的另合成方法。相应地,醇 5 可用羟基芳基酯 8 在三芳基或三烷基膦,如三苯基膦或三正丁基膦和偶氮二甲酸二乙酯存在的情况下,在惰性溶剂,如 THF 或二氯甲烷中进行反应,以生成偶联酯 8。反应温度通常为室温和该惰性溶剂的回流温度之间。

[0108] 方案 B

[0109]



[0110] 方案C例式I的化合物的合成,其中Z为 $-(\text{CH}_2)_n-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-$ 。该方案在合成其中连接到ARYL的亚烷基链中的n代表1或2的化合物方面最为有用。在步骤C1中,化合物5(Y=O)被转化成化合物6(其中Lg为氯或溴),如方案B的步骤B2中所述。化合物6然后与硫脲——化合物11在与M. et al. Heterocycles, 2001, 55(9), 1727-1735中描述的类似条件下进行反应,以生成硫醇5a。

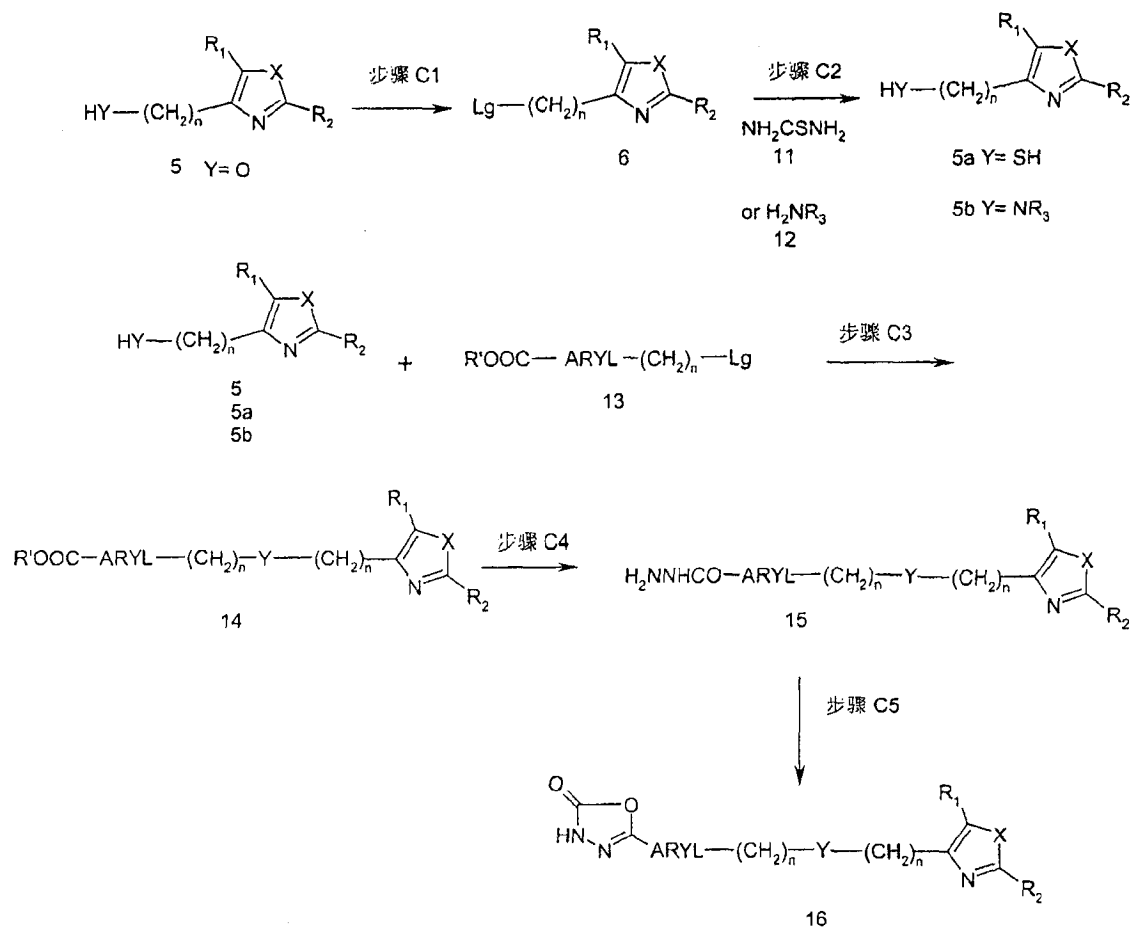
[0111] 当化合物6与伯胺12反应时,则生成氨烷基杂环5b。利用胺来置换离去基团这一技术为本领域技术人员所熟知。典型情况下,置换反应在极性溶剂中,在有机碱存在的情况下进行,该有机碱起除酸剂的作用。虽然温度并不关键,但是置换反应在室温到溶剂的回流温度之间进行。

[0112] 在步骤C3中,化合物5、5a和5b可与化合物13反应,生成偶联芳基酯14,其中Y是O、S或 NR_3 。因此,当化合物5(Y=O)和5a(Y=S)与13反应以置换离去基团时,反应通常在大约0°C到150°C之间的温度下,在极性质子惰性溶剂,如DMF或DMSO中,在强碱如氢化钠存在的情况下进行。当化合物5b(Y= NR_3)与14反应时,采用与上文步骤C2对伯胺所述相同的反应条件。

[0113] 利用化合物14合成所需的1,3,4-噁二唑-2-酮16是通过两个步骤(C4和C5)完成的,这两个步骤与方案B中步骤B4和步骤B5描述的完全相同。

[0114] 方案C

[0115]



[0116] 方案D给出了式I的化合物合成的备选方法,其中Z为 $-(\text{CH}_2)_n-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-$ 。该方案在合成其中连接到ARYL的亚烷基链中的n代表3到5的化合物方面最为有用。

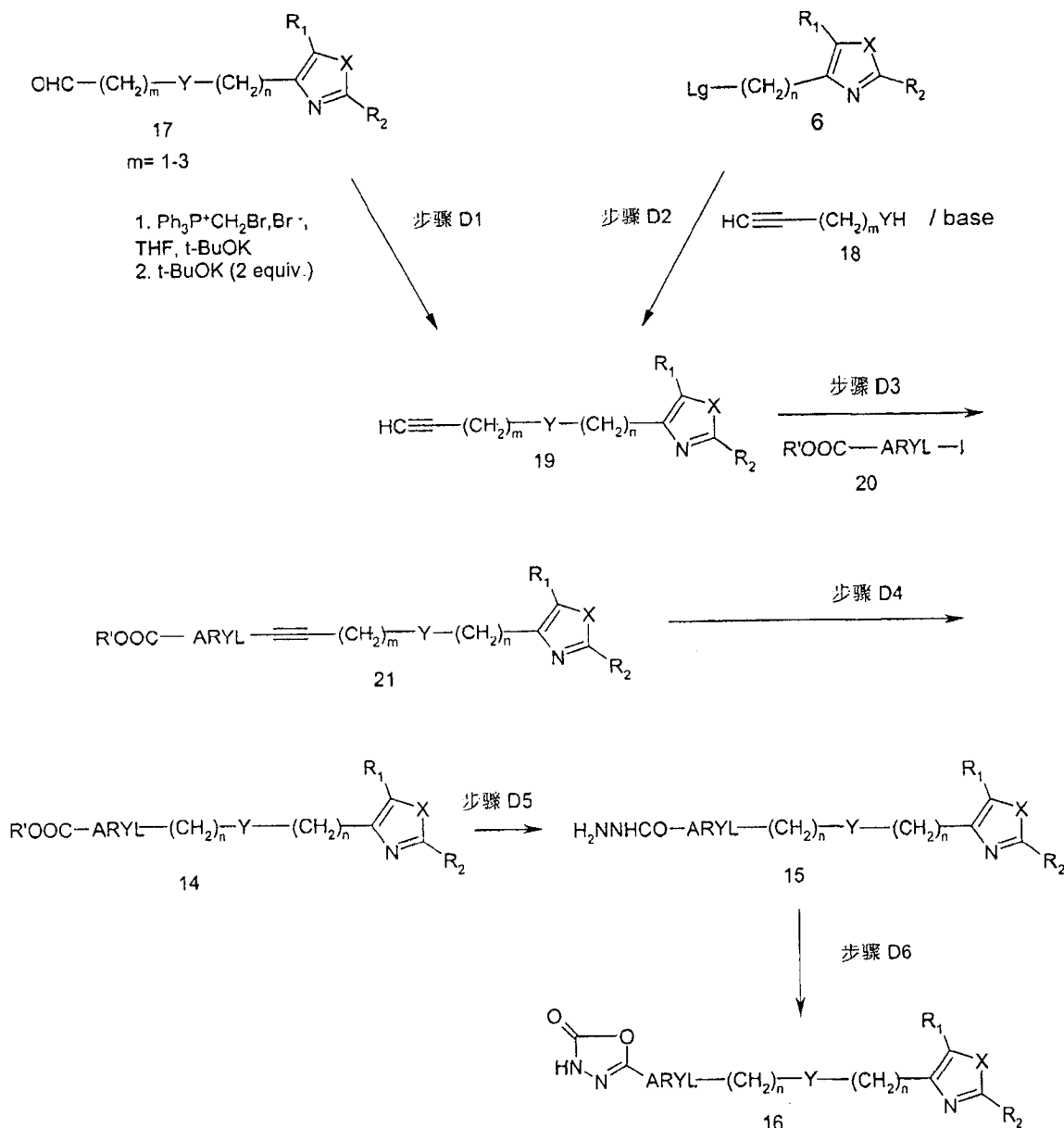
[0117] 在步骤D1中,可通过方案A中所述的方法合成的末端醛化合物17通过两步反应顺序转化成末端乙炔19。因此,17与溴代亚甲基三苯基正膦(第一步)和叔丁醇钾(t-BuOK)反应生成中间体溴代烯烃(未显示),该中间体然后用2当量的t-BuOK处理(第二步)生成乙炔19。该转化的反应顺序请见Pianetti, P., Tet. Letters, 1986, 48, 5853-5856。另请参见Corey, E. J., et al. J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, 4318-4320。另外,如步骤D2所示,19类型的中间体可通过用亲核试剂,如18从中间体,如6(见方案C)置换离去基团而制备,其中掺入了末端乙炔。

[0118] 在步骤D3中,乙炔中间体19与芳基碘20的Sonogashira偶联反应是在四(三苯基膦)钯(0)、碘化亚铜和适当的碱存在的条件下,在惰性溶剂中进行的,以生成偶联的末端乙炔21。乙炔21可在步骤D4中通过化合物21的催化氢化作用实现还原,从而生成饱和酯14。该还原反应通常可在惰性有机溶剂中,在氢气压为30到300p. s. i. 下,利用催化剂,如披钯碳或三(三苯基膦)氯化铑而实现。该还原反应可在室温到175°C的温度下进行。

[0119] 利用化合物14合成所需的1,3,4-噁二唑-2-酮16是通过两个步骤(D5和D6)完成的,这两个步骤与方案B步骤B4和步骤B5中描述的完全相同。

[0120] 方案D

[0121]



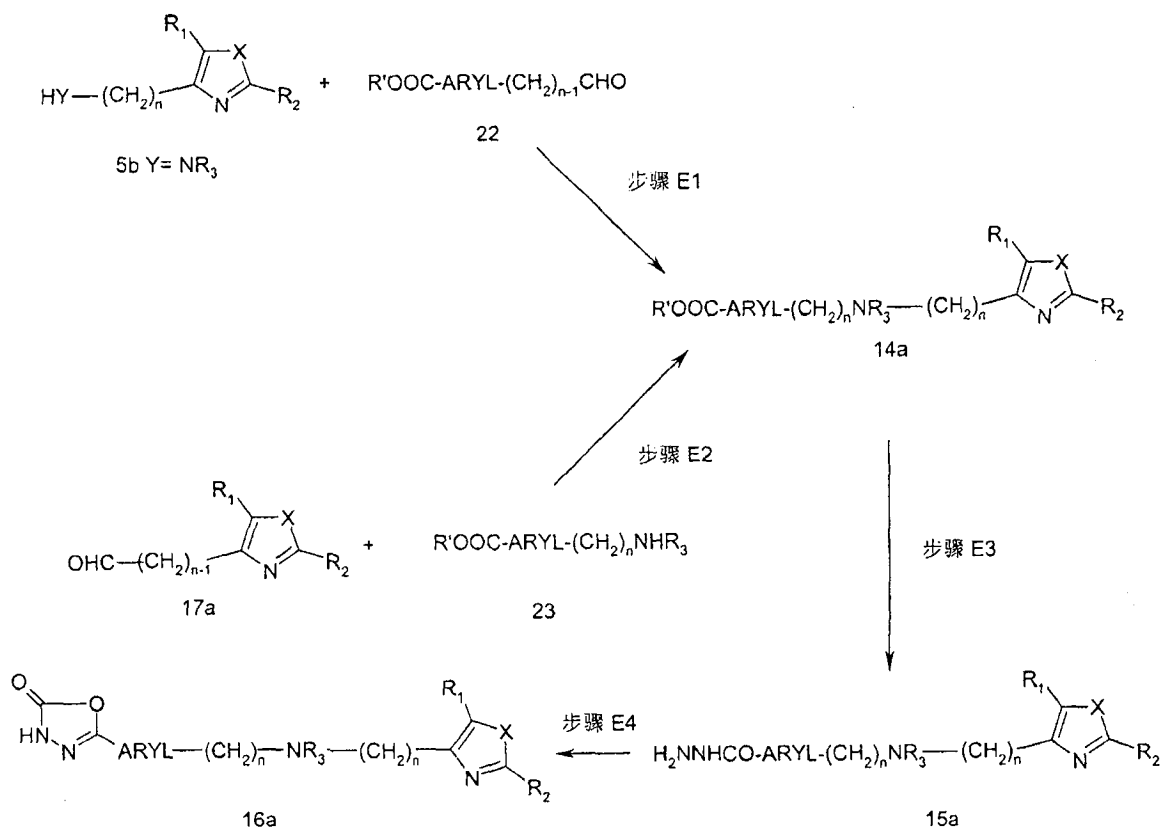
[0122] 方案E例式I的化合物的特定合成方法,其中Z为 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}_3(\text{CH}_2)_n-$ 。在这一方法中,连接体Z是通过利用胺对醛进行还原胺化而构建的。例如,在步骤E1中,在极性溶剂,通常为醇或醇 THF 混合物中,利用醛,如 4- 甲酰苯甲酸甲酯 ($n=1$)、化合物 22 对 5b 进行处理,接着用还原剂,如三乙酰氧基硼氢化钠进行处理,可提供所需的中间体 14a ($n=1$)。

[0123] 类似地,在步骤E2中,利用胺,如 4- 氨基烷基苯甲酸甲酯 ($n=1$),化合物 23 处理醛,如 17a,产生 14a,其中, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}_3$ 中 n 为 1, R_3 为 H。步骤 E3 和 E4 中的化合物 14a 按方案 B 步骤 B4 和 B5 的说明转化成 1,3,4- 噁二唑 -2- 酮 16a。

[0124] 更广泛地说,可从相应的脎或硝基化合物通过催化氢化作用或从炔属胺和芳基碘或芳基溴通过 Sonogashira 偶联,再按方案 D 中所述催化氢化制备适当的胺 ($\text{R}'\text{OOC}-\text{ARYL}-(\text{CH}_2)_n\text{NHR}_3$)。

[0125] 方案 E

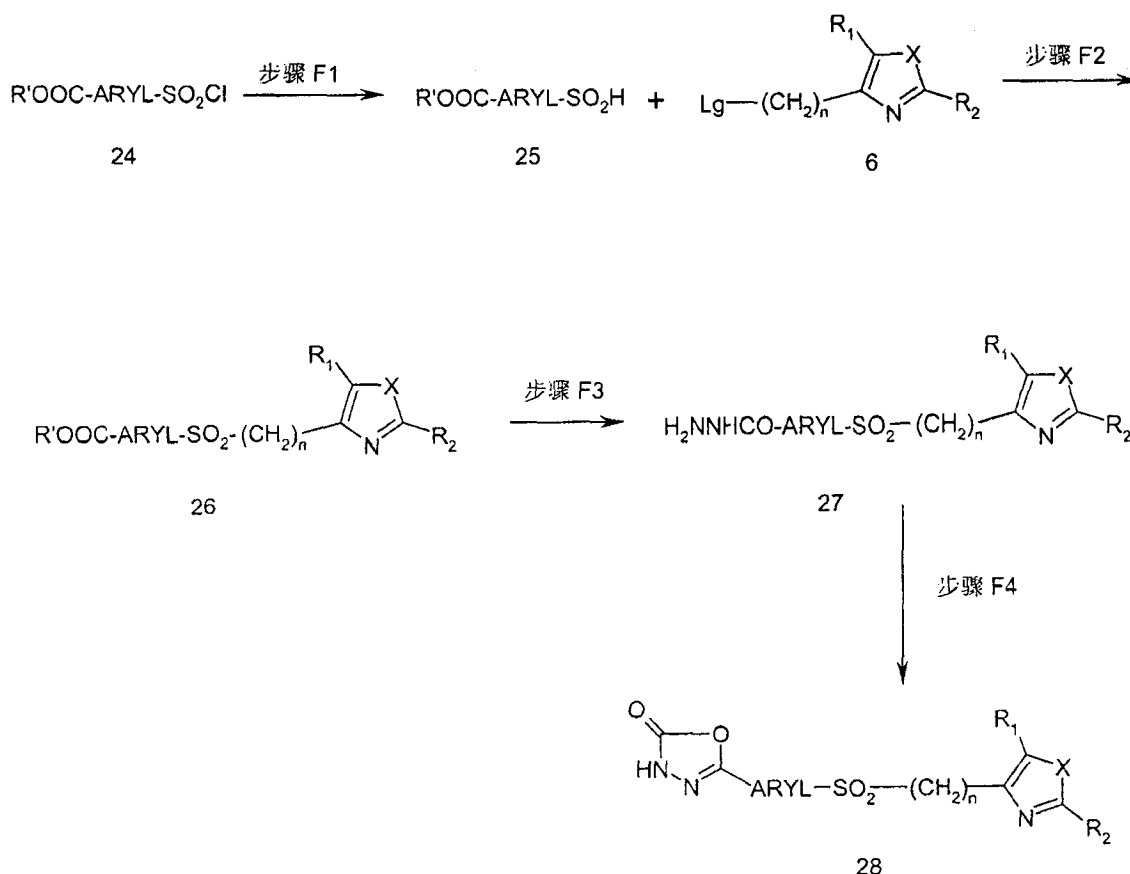
[0126]



[0127] 方案F例示式I的化合物的合成,其中Z为 $-\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n-$ 。在步骤F1中,芳香磺酰氯24以亚硫酸钠水溶液处理得到亚磺酸25。在步骤F2中,25与中间体,如6在极性溶剂,如DMF、乙腈或乙醇中,在碱,如DBU、吡啶、甲醇钠或氢氧化钠存在的情况下反应,可提供中间体26。中间体26在步骤F3和F4中被转化成1,3,4-噁二唑-2-酮28,如方案B中的步骤B4和B5所示。

[0128] 方案F

[0129]



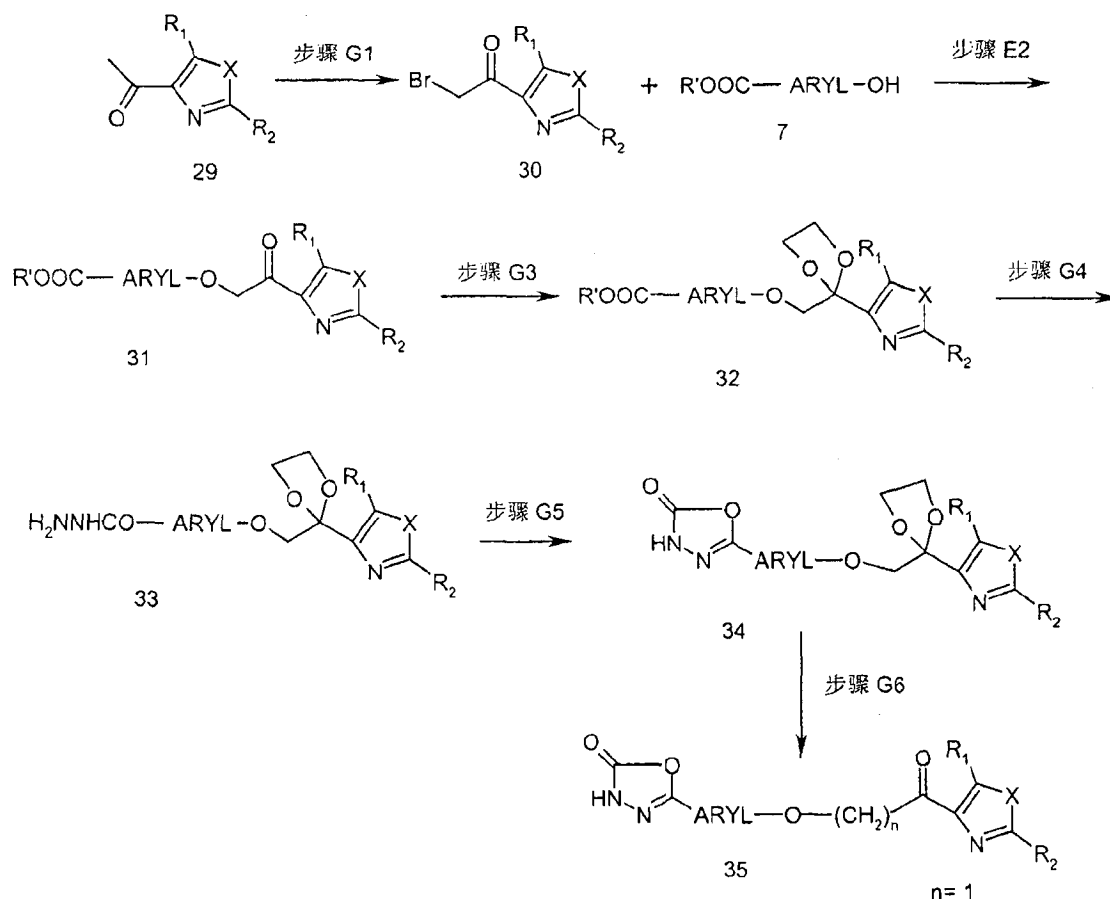
[0130] 方案 G 例示其中 Z 为 $-O(CH_2)_nCO-$ 的式 I 化合物的合成。本方案的图示了其中 n 为 1 的情况。起始化合物 2- 酰基杂环 29 可通过对中间体 N- 甲氧基 N- 甲基羧酰胺加入格氏试剂从相应的羧酸来制备 (制备方法如方案 A 所示) (Khlestkin, V. K. et al.; Current Organic Chemistry, 2003, 7(10), 967-993. 和 Singh, J. et al., Journal für Praktische Chemie, 2000, 342, 340-347)。中间体 N- 甲氧基 N- 甲基羧酰胺最简便的制备方法是在肽偶联试剂, 如 EDC、DCC、DMPU 以及叔胺碱, 如二异丙基乙胺或三乙胺存在的情况下, 通过酸与 N- 甲氧基 -N- 甲基羟胺盐酸盐反应进行。

[0131] 有了 29 后, 即可对其进行溴化处理, 以生成溴代酮 30, 如步骤 G1 所示。溴化作用可通过众所周知的方法实现, 如通过 29 与溴化吡啶鎓在乙酸中反应, 或通过 29 与 Br_2 在惰性有机溶剂如二氯甲烷中反应进行。步骤 G2 中形成的溴代酮 30 与芳基羟基酯 7 在方案 B (步骤 B3) 中描述的条件下反应, 从而给出偶联酯 31。如步骤 G3 所示, 31 中的酮官能团通过本领域众所周知的方法被保护为缩酮 32。在步骤 G4 到 G5 中, 化合物 32 然后通过方案 B 中描述的标准顺序 (步骤 B4 和 B5) 转化成 1, 3, 4- 噁二唑 -2- 酮缩酮 34。最后, 在步骤 G6 中, 用溶于 THF- 甲醇 - 水中的无机酸或本领域其它已知的方法裂解 34 中的缩酮官能团, 从而产生目标结构 35。

[0132] 本领域技术人员显而易见的是, 可以利用上面方案 G 的步骤合成化合物 35 的类似物, 其中 n 为 2-5, 可用具有更大的溴代烷酰基取代基 ($Br(CH_2)_nCO-$, 其中 n 为 2 到 5) 的溴代酮化合物 30 作为起始材料。

[0133] 方案 G

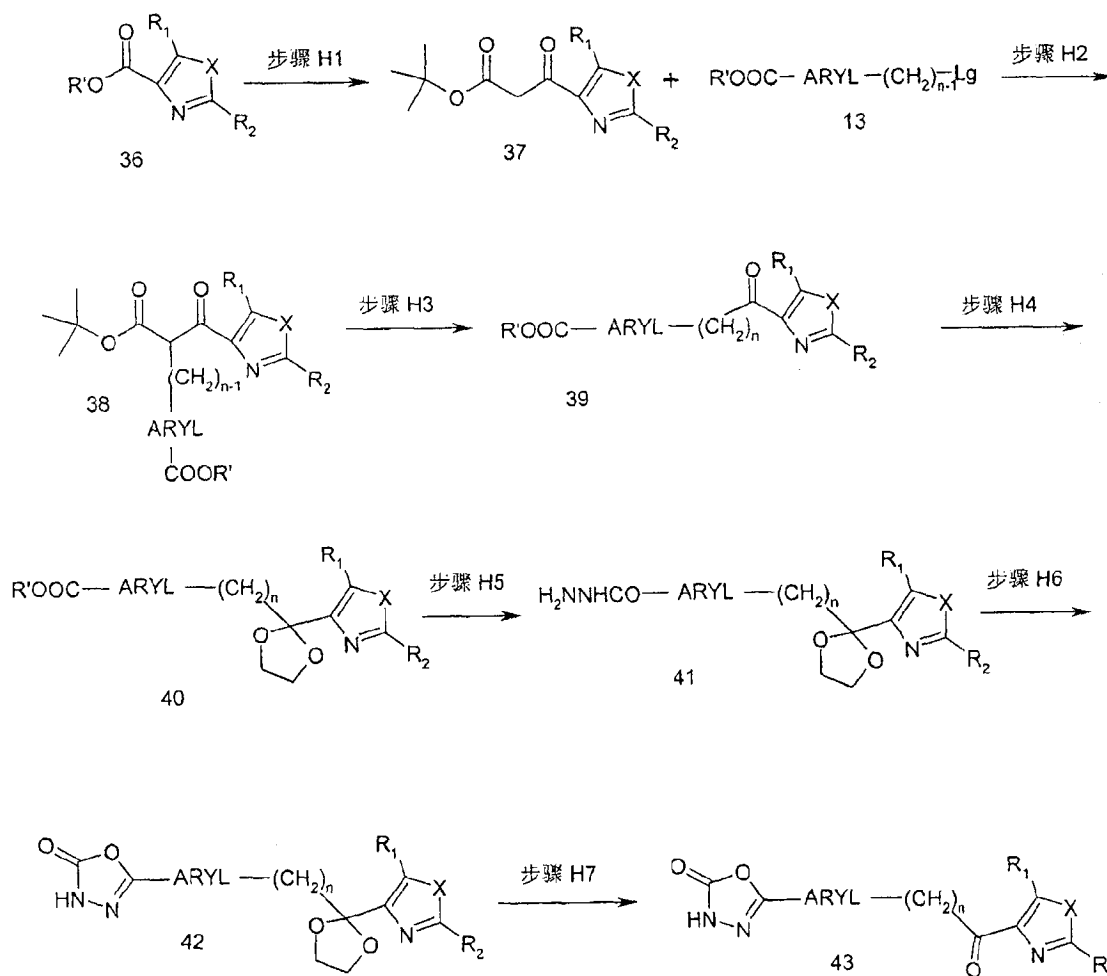
[0134]



[0135] 方案H例示了其中Z为 $-(CH_2)_nCO$ 的式I化合物的制备步骤。在步骤H1中,在 $-78^\circ C$ 到室温的条件下,在溶剂,如THF或DME中,用两当量的叔丁基乙酸酯的锂烯醇化物对适当的甲氧基羰基取代的杂环36进行处理,从而生成丙酮酸中间体37。在步骤H2中,在 $-10^\circ C$ 到室温之间的温度下和惰性溶剂中,用碱,如氢化钠对37进行处理,接着对形成的阴离子用亲电子试剂,如13进行烷基化,则生成高级中间体酮酸二酯38。步骤H3中所示的脱羧化作用可通过先用TFA在惰性溶剂,如二氯甲烷中对38进行处理,接着在 $70^\circ C$ 到 $150^\circ C$ 的温度范围内进行热解,从而产生中间体酮酸酯39。如步骤H4所示,39中的酮官能团通过本领域众所周知的方法被保护为缩酮40。在步骤H5到H6中,化合物40然后通过方案B中描述的标准顺序(步骤B4和B5)转化成1,3,4-噁二唑-2-酮缩酮42。最后,在步骤H7中,42中的缩酮官能团被裂解,如方案G中步骤G6所示,从而给出所需的1,3,4-噁二唑-2-酮,即化合物43。

[0136] 方案H

[0137]



[0138] 生物学实施例：

[0139] 下面的测试程序用来确定本发明化合物的生物学性质。为了进一步例示本发明，提供了如下实例。但是，这些实例不应该被理解成以任何方式限制本发明。

[0140] 基于细胞的 PPAR- δ -GAL4 分析中的 EC₅₀ 值的测定：

[0141] 原理

[0142] 利用稳定转染的 HEK 细胞系 (HEK = 人胚胎肾) 分析了结合人 PPAR- δ 上并以激动方式激活它的物质之效力，该 HEK 细胞系此处称为 PPAR- δ 报道细胞系。PPAR- δ 报道细胞系包含两种遗传元件，萤光素酶报道元件 (p δ taM-GAL4-Luc-Zeo) 和 PPAR- δ 融合蛋白 (GR-GAL4-人 PPAR- δ -LBD)，其根据 PPAR- δ 配体介导萤光素酶报道元件的表达。在 PPAR- δ 报道细胞系的细胞核中稳定并且组成性表达的融合蛋白 GR-GAL4-人 PPAR- δ -LBD 通过 GAL4 蛋白质部分结合到稳定整合到细胞系基因组的萤光素酶报道元件 5' - 上游的 GAL4DNA 结合基序。在本分析中，如果使用脂肪酸耗竭的胎牛血清 (cs-FCS)，在没有 PPAR- δ 配体的情况下，萤光素酶报道基因仅有很少表达。PPAR- δ 配体结合并激活 PPAR- δ 融合蛋白，从而刺激萤光素酶报道基因的表达。形成的萤光素酶可通过适当的底物用化学发光法进行检测。

[0143] PPAR- δ 报道细胞系的构建：

[0144] 稳定的 PPAR- δ 报道细胞系的产生基于利用萤光素酶报道元件稳定转染的稳定的 HEK- 细胞克隆。这一步骤在上面的“PPAR- α 报道细胞系的构建”中已有说明。在第

第二步中, PPAR- δ 融合蛋白 (GR-GAL4- 人 PPAR- δ -LBD) 被稳定地引入这一细胞克隆。为此目的, 将编码糖皮质激素受体 (检索号 P04150) 的 N- 末端 76 个氨基酸的 cDNA 连接到编码酵母转录因子 GAL4 (检索号 P04386) 的氨基酸 1-147 的 cDNA 段。人 PPAR- δ 受体 (氨基酸 S139-Y441 ; 检索号 L07592) 的配体结合域的 cDNA 被克隆到这一 GR-GAL4 构建体的 3'- 末端。这样制备的融合构建体 (GR-GAL4- 人 PPAR- δ -LBD) 然后重新克隆到质粒 pcDNA3 (Invitrogen) 以便通过巨细胞病毒启动子能够进行组成性表达。利用限制核酸内切酶将该质粒线性化, 并将之稳定转染到前述包含萤光素酶报道元件的细胞克隆。所得到的包含萤光素酶报道元件并能够组成性表达 PPAR- δ 融合蛋白 (GR-GAL4- 人 PPAR- δ -LBD) 的 PPAR- δ 报道细胞系通过 zeocin (0.5mg/ml) 和 G418 (0.5mg/ml) 选择而分离。

[0145] 分析步骤和评估:

[0146] PPAR- δ 激动剂的活性通过下面所述的三天分析来测定:

[0147] 第 1 天

[0148] PPAR- δ 报道细胞系在与以下添加物混合后的 DMEM (#41965-039, Invitrogen) 中培养到 80 % 汇合: 10 % Cs-FCS (胎牛血清; #SH-30068.03, Hyclone)、0.5mg/ml zeocin (#R250-01, Invitrogen)、0.5mg/ml G418 (#10131-027, Invitrogen)、1% 青霉素-链霉素溶液 (#15140-122, Invitrogen) 以及 2mM L- 谷氨酰胺 (#25030-024, Invitrogen)。将标准细胞培养瓶 (#353112, Becton Dickinson) 置于细胞培养箱 37°C 下在 5% CO₂ 存在的情况下进行培养。用 15ml PBS (#14190-094, Invitrogen) 洗涤 80% - 汇合的细胞, 并用 3ml 胰蛋白酶溶液 (#25300-054, Invitrogen) 在 37°C 下处理 2 分钟, 用 5ml 所述的 DMEM 溶液吸收, 并在细胞计数器上计数。稀释到 500,000 个细胞 /ml 后, 在带有透明塑料底的 96 孔微量滴定板 (#3610, CorningCostar) 上每孔 180 μ L 中接种 35,000 个细胞。微量滴定板在 5% CO₂ 气氛中于 37°C 温度下在细胞培养箱中培养 24 小时。

[0149] 第 2 天

[0150] 将待测试的 PPAR- δ 激动剂溶解于 DMSO, 浓度为 10mM。该贮存液用混合有 5% Cs-FCS (#SH-30068.03, Hyclone)、2mM L- 谷氨酰胺 (#25030-024, Invitrogen) 及前述抗生素 (zeocin、G418、青霉素和链霉素) 的 DMEM (#41965-039, Invitrogen) 稀释。以 11 种不同的浓度对测试物质进行了测试, 浓度范围为 10 μ M 到 100pM。效力更强的化合物的测试浓度范围为 1 μ M 到 10pM, 或在 100nM 到 1pM 之间。

[0151] 无论第一天接种的 PPAR- δ 报道细胞系培养基是否用抽吸法完全去除, 在培养基中稀释的测试物质被立即加到细胞中。稀释和加入物质是利用机器人 (Beckman FX) 进行的。培养基中稀释的测试物质的最终体积为 96 孔微量滴定板的每孔 100 μ L。本分析中的 DMSO 浓度低于 0.1% v/v 以避免溶剂的细胞毒性效应。

[0152] 每个微量滴定板加入了同样以 11 种浓度稀释的标准 PPAR δ 激动剂, 以阐明每个板的分析功能。分析板在 5% CO₂ 气氛中于 37°C 温度下在培养箱中培养 24 小时。

[0153] 备选地, 直接向含有铺板细胞的 180 μ L 中加入 20 μ L 的 10x 终浓度的测试物质。在这次分析的微量滴定板配置中, 对测试物质以 8 种浓度一式三份地进行了测试。

[0154] 第 3 天

[0155] 从培养箱中取出用测试物质处理过的 PPAR- δ 报道细胞, 并用抽吸法除去培养基。向 96 孔微量滴定板的每孔中移入 50 μ L 的 Bright G10 试剂 (购自 Promega), 使细胞

裂解。在室温黑暗条件下培养 10 分钟后,在 Wallac 公司的 Trilux 发光计中对微量滴定板进行测量。微量滴定板每孔测量时间为 1 秒。

[0156] 评估:

[0157] 发光计的原始数据转移到 Microsoft Excel 文件中。利用制造商 (IDBS) 指定的 XL Fit 程序计算了 PPAR 激动剂的剂量 - 效应图和 EC_{50} 值。

[0158] 为本申请实例中 PPAR 调节剂测量了浓度范围 1nM 到 $> 10 \mu M$ 的 PPAR- δ EC_{50} 值。式 I 的本发明化合物可作为激动剂或拮抗剂。下面描述测定部分激动剂或拮抗剂活性的分析。

[0159] 测定部分激动剂或拮抗剂对 PPAR- δ 受体的有效性

[0160] 本分析确定本发明化合物作为 PPAR- δ 受体的部分激动剂还是拮抗剂。

[0161] 分析板的接种和收获如上面第 1 天和第 3 天所述。

[0162] 第 2 天

[0163] 用混合有 10% Cs-FCS (#SH-30068.03, Hyclone)、2mM L- 谷氨酰胺 (#25030-024, Invitrogen) 及前述抗生素 (zeocin、G418、青霉素和链霉素) 的 DMEM (#41965-039, Invitrogen) 将部分激动剂或拮抗剂以及已知的选择性激动剂稀释到 20X 需要的终浓度。向含有细胞的分析板中加入 10 微升部分激动剂或拮抗剂。分析板在 5% CO_2 气氛中于 37°C 温度下在培养箱中培养 30 分钟。在部分激动剂或拮抗剂预培养后,加入 10 微升上述 20X 已知的选择性激动剂。分析板在 5% CO_2 气氛中于 37°C 温度下在培养箱中培养 24 小时。测定了每个部分激动剂或拮抗剂浓度对已知选择性激动剂 EC_{50} 的效应。

[0164] SPA PPAR- δ -LBD 结合分析

[0165] 贮存液:

[0166] 1M Tris (pH = 8.0 或 pH = 7.6) (Gene Medicine Stock Room)

[0167] 2M KCl (粉末溶于 N2140 中)

[0168] Tween 20

[0169] 100mM DTT

[0170] 13.9 μM GW2331 的 EtOH 溶液 热

[0171] 10mM GW 2331 的 DMSO 溶液 冷

[0172] PPAR- α (浓度有变化)

[0173] Ex :. 884 $\mu g / \mu l$

[0174] 洗涤缓冲液: (储存于 4°C。缓冲液可使用一周)

[0175] 10mM Tris (pH = 7.6 或 8) 10ml

[0176] 50mM KCl 25ml

[0177] 0.05% Tween 20 0.5ml

[0178] Millipore 水 964.5

[0179] 校准 PH = 7.6

[0180] 结合缓冲液: (每次制备新鲜的结合缓冲液)

[0181] 洗涤缓冲液 50ml

[0182] 10mM DTT 5.5ml

[0183] 每板反应试剂的制备:

- [0184] 谷胱甘肽包被的 SPA 珠
- [0185] 每个 SPA 珠瓶含有 500mg 珠
- [0186] 在 5ml 洗涤缓冲液中重构 500mgSPA 珠,可用几周
- [0187] 储存于 4℃
- [0188] 制备用结合缓冲溶液稀释的 SPA 珠
- [0189] 向 60ml 结合缓冲溶液中加入 1ml 上述重构的 SPA 珠
- [0190] 向 96 孔板的每个孔中加入 20 μ l 上述经稀释的珠。
- [0191] 每个板用 2ml 上述经稀释的珠 (不包括死体积)。
- [0192] 3H GW-2331 加上 GST-PPAR- δ -LBD (一个 96-孔板,无死体积)
- [0193] 13.9 μ M40nM/ 孔
- [0194] 3.0ml/ 板 (包括死体积)
- [0195] 如果 3H-GW2331 比活性为 1mci/ml (购自 Amersham), 那么稀释 17 μ l 的 3H GW-2331 到 3.0ml 结合缓冲溶液中 = .08 μ M
- [0196] 如果蛋白质浓度为 1mg/mL, 加入 21 μ l 蛋白质到 3.0ml 结合缓冲溶液中。
- [0197] 总结: 一个 96 孔板 :3000 μ L 结 合 缓 冲 溶 液 +17 μ L 3H-GW2331+21 μ L GST-PPAR- δ (1mg/ml)
- [0198] 对照板
- [0199] 一个 96-孔母板 (用于两个对照板)
- [0200] 在第一列:
- [0201] 向 E-H 孔中加入 5 μ l 冷 GW2331 (10mM)。
- [0202] 向 A-H 孔中加入 45 μ L DMSO。
- [0203] 在第十二列 (三倍稀释):
- [0204] 向 A 孔中加入 10 μ L 冷的 GW2331 (10mM)。
- [0205] 然后向 A 孔中加入 90 μ l DMSO, 将溶液混合均匀。
- [0206] 向 B-H 孔中加入 20 μ L DMSO。
- [0207] 从 A 孔中取出 10 μ l 溶液, 加到 B 孔中, 混合均匀,
- [0208] 从 B 孔中取出 10 μ l 溶液, 加到 C 孔中, 混合均匀
- [0209] 从 C 孔中取出 10 μ l 溶液, 加到 D 孔中, 混合均匀。
- [0210] 最后, 从 F 孔中取出 10 μ l 溶液, 加到 H 孔中。
- [0211] 对照板 (用于 8 个反应板)
- [0212] 对照板为母板的 1 : 10 稀释。稀释缓冲液为洗涤缓冲液。
- [0213] 样品板
- [0214] 向新鲜的 CPC 文库板中, 加入 90 μ l DMSO。
- [0215] 取出 10 μ l DMSO 稀释液并加到样品板中的 90 μ l 洗涤缓冲液中。
- [0216] 反应板:
- [0217] 向反应板的每个孔中加入 20 μ l SPA 珠和 30 μ l 带有 GST-PPAR- δ 的 3H-GW2331。
- [0218] 从样品板的每个孔中取出 5 μ l 化合物, 并加到反应板的第二列到第 11 列。
- [0219] 从对照板的第一列和第十二列取出 5 μ l 化合物, 并加入反应板的第一列和第十二列中。

[0220] 96-孔 SPA 方案：

[0221] 让反应板平衡 20 分钟到 2 小时。

[0222] 密封反应板，然后在 Microbeta 计数器 (Wallac) 上计数。

[0223] 计算 IC_{50} 。

[0224] 在 SPA PPAR- δ -LBD 结合分析中，测定了本申请实例的 PPAR 调节剂的浓度范围在 1nM 到 $> 10 \mu M$ 的 IC_{50} 值。式 I 的本发明化合物可作为激动剂或拮抗剂。

[0225] 大鼠 / 小鼠少突胶质细胞培养物

[0226] 细胞的制备：

[0227] 1. 利用 McCarthy 和 de Vellis(1980) 最初描述的技术的改良技术，从星形胶质细胞单层机械分离除去小胶质后，从新生大鼠或小鼠的新皮质（出生后 2-3 天）获取原代大鼠少突胶质细胞祖细胞，并加以富集。

[0228] 2. 从新生大鼠大脑中除去脑膜，并以机械方式使组织分离开来。将细胞接种于 T75 瓶中，并用 DMEM/F12+10% FBS 喂饲细胞。

[0229] 3. 在原来制备日期 14 天后，利用抖落法收集在星形胶质细胞底层上生长的少突胶质细胞。离心悬浮液，并将细胞沉淀物重新悬浮在无血清的培养基 (SFM；组合了 $25 \mu g/ml$ 转铁蛋白 (transferrin)、 $30nM$ 三碘甲腺原氨酸、 $20nM$ 氢化可的松、 $20nM$ 黄体酮、 $10nM$ 生物素、 $1 \times$ 痕量元素、 $30nM$ 硒、 $1 \mu g/ml$ 腐胺、 0.1% BSA、 $5U/ml$ PenStrep、 $10 \mu g/ml$ 胰岛素的 DMEM) 中，并补充以下生长因子：血小板衍生生长因子-AA (PDGF)、成纤维细胞生长因子-2 (FGF)。

[0230] 4. 将细胞接种在涂有 PDL 的培养皿上，并在 $37^{\circ}C$ 、 $6-7\%$ CO_2 气氛中培养。

[0231] 5. 每 48 个小时更换培养基组分，以便使细胞保持祖细胞状态。

[0232] 祖细胞传代以增加供筛选分析的细胞数：

[0233] 1. 培养物汇合后，用 PBS 冲洗培养物，加入胰蛋白酶并在 $37^{\circ}C$ 培养 $\sim 2-3$ 分钟。

[0234] 2. 中和并在 $900g$ 离心细胞悬浮液 5 分钟。

[0235] 3. 将细胞沉淀重新悬浮在 SFM+PDGF/FGF 中。

[0236] 4. 每 48 个小时加入新鲜生长因子，以保持富集快速分裂的祖细胞。

[0237] 5. 在实验分析之前，细胞传代不超过 4-5 次。

[0238] 6. 所有涉及少突胶质细胞祖细胞的实验都是用持续维持在这些条件下的细胞进行的。95% 以上的细胞为 A2B5 免疫阳性并表达 2'3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶 II mRNA。

[0239] 7. 为了产生成熟的少突胶质细胞，接种后 24 小时，将祖细胞转移到补充或不补充 IGF-I 的 SFM，并在实验分析之前 7 天在这些条件下生长。

[0240] 8. 备选地，可使用富集的大鼠中央神经胶质-4 (CG4) 祖细胞系，该祖细胞系保持在基本培养基 (DMEM，含有 $2mM$ 谷氨酰胺、 $1mM$ 丙酮酸钠、生物素 ($40nM$)、胰岛素 ($1 \mu M$) 以及 N1) 中，并补充来自 B-104 成神经细胞瘤细胞系的 30% 条件培养基。为了诱导分化，将 CG4 细胞换到含有 1% 胎牛血清（两天后除去）和胰岛素 ($500nM$) 的基本培养基。A2B5 和 MBP 免疫活性分别用来证实未成熟和成熟培养物的富集 $> 95\%$ 。

[0241] 大鼠 / 小鼠培养物化合物处理：

[0242] 1. 在包被 PDL 的 24 孔板上加入 10,000-15,000 个细胞 / 孔，在促细胞分裂剂 ($10ng/ml$) 存在的情况下培养细胞过夜。

[0243] 2. 在促细胞分裂剂存在的情况下：

[0244] a. 第二天，除去原来的培养基，并将化合物加到新鲜的（含有促细胞分裂剂的）培养基中。

[0245] b. 在 6 种不同浓度（10 μ M、1 μ M、100nM、10nM、1nM 以及 0. 1nM）下进行化合物剂量反应评价；

[0246] c. 对每种化合物浓度运行一式三份的孔。

[0247] 3. 在促细胞分裂剂不存在的情况下：

[0248] a. 第二天，除去旧的培养基，并将化合物加到新鲜的（不含促细胞分裂剂的）培养基中。

[0249] b. 在 6 种浓度（10 μ M、1 μ M、100nM、10nM、1nM 以及 0. 1nM）下进行化合物剂量反应评价；

[0250] c. 对每种化合物浓度运行一式三份的孔。

[0251] 4. 在用于实验分析之前，将处理过的细胞培养 7 天。

[0252] 人少突胶质细胞培养物

[0253] 细胞的制备：

[0254] 1. 从 E19. 5-E22 人胚胎皮层收集的人神经球 (neurosphere) 在祖细胞培养基（含有 100 μ g/ml 转铁蛋白 (transferrin)、30nM 三碘甲腺原氨酸、20nM 氢化可的松、20nM 黄体酮、10nM 生物素、1x 痕量元素、30nM 硒、60uM 腐胺、0. 1% BSA、5U/ml PenStrep、25 μ g/ml 胰岛素的 DMEM/F12 并补充有 PDGF 和 FGF）中培养 2 周。

[0255] 2. 神经球用 20U/ml 木瓜蛋白酶在 37℃ 下分离 30-50 分钟。

[0256] 3. 细胞接种到包被 PDL 的培养皿上，在含有 PDGF/FGF 的祖细胞培养基中的密度为 50, 000-100, 000 个细胞 / 孔，在 37℃ 下和 5-6% CO₂ 气氛中培养。

[0257] 4. 每 48 个小时补充培养基和生长因子。

[0258] 人培养物化合物处理：

[0259] 1. 接种后 24 到 48 小时，除去原来的培养基，并将化合物加到新鲜的（含有促细胞分裂剂）培养基中。

[0260] 2. 在 3-6 种不同浓度（10 μ M、1 μ M、100nM、10nM、1nM 以及 0. 1nM）下进行化合物剂量反应评价。

[0261] 3. 对每种化合物浓度运行一式三份的孔。

[0262] 5. 在用于实验分析之前，将处理过的细胞培养 7 天。

[0263] 大鼠 / 小鼠 / 人少突胶质细胞特异的免疫染色：

[0264] 在接触化合物后，少突胶质细胞特异的抗体被用来评估该化合物加速 / 促进少突胶质细胞分化的能力（例如，化合物处理过的和未处理的培养物之间 O4、O1 或髓鞘碱性蛋白免疫反应性随时间的变化）。

[0265] 1. 细胞接种到用聚-D-赖氨酸处理过的 4 孔腔式载玻片上，浓度为 5×10^3 到 20×10^3 个细胞 / 孔，并如上述生长。如在体外没有 PDGF 和 FGF 的天数确定的，对少突胶质细胞群按逐渐增加的细胞分化程度进行顺序染色。

[0266] 2. 利用在 37℃ 下对活细胞染色 30 分钟来检测少突胶质细胞期特异细胞表面标记物的表达（包括 A2B5、O4 和 O1）。

- [0267] 3. 其后,在室温下用 4%多聚甲醛固定细胞 10 分钟。
- [0268] 4. 固定染色步骤用来检测少突胶质细胞期特异标记物的表达(包括髓鞘碱性蛋白 MBP)。
- [0269] 5. 用 PBS 冲洗。
- [0270] 6. 在室温下,用 1X PBS 稀释过的 0.1% Triton/0.01% NaAz 透化 10 分钟。
- [0271] 7. 在室温下,用溶于抗体稀释缓冲液的 5-10%山羊血清(0.1% Triton-X100 和 1%无 IgG 的牛血清蛋白;也用来稀释抗体)封闭 15 分钟。
- [0272] 8. 加入用抗体稀释缓冲液稀释的一级抗体。
- [0273] 9. 在 4℃下轻微摇动温育过夜。
- [0274] 10. 第二天,在室温下用 PBS 1X 冲洗 5 分钟,接着用 3X 冲洗,每次 15 分钟。
- [0275] 11. 在室温下用适当的二级抗体温育 45 分钟。
- [0276] 12. 在室温下,用 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)对细胞核进行染色 15 分钟。
- [0277] 13. 用 PBS 冲洗几次,并用荧光显微术进行评估。
- [0278] 14. 对以下条件按时间变化以及不同的化合物剂量进行了比较:仅 PDGF/FGF、仅 SFM、仅 SFM-IGF1、PDGF/FGF 和化合物、SFM 和化合物。
- [0279] 大鼠/小鼠/人溴脱氧尿苷(BrdU)免疫染色:
- [0280] 以确认化合物不会促进细胞增殖。
- [0281] 1. 用 10 μ M BrdU 对少突胶质细胞祖细胞标记 20 小时,然后用 70%乙醇或 4%多聚甲醛固定。
- [0282] 2. 细胞连续用生物素化的小鼠抗-BrdU 和链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶温育,中间用 PBS 洗涤三次。
- [0283] 3. 用 DAB 对 BrdU 免疫反应性进行显色,并用计数器-染料苏木精估计总细胞数。
- [0284] 4. BrdU 免疫阳性细胞由两个独立的观察者进行计数。
- [0285] 大鼠/小鼠人培养物图像分析:用荧光显微术对接触化合物后的少突胶质细胞分化程度进行定量。这一分析表明选择性激动剂加速/促进少突胶质细胞的分化。
- [0286] 1. 人工细胞计数:对每个实验条件随机选择四个视野,每个视野的细胞计数为 500-600 细胞。比较了对照和药物处理组中 MBP(或 O4)免疫阳性细胞(含有带有或不带有髓鞘质片细胞的成熟过程)与 DAPI 阳性细胞(总细胞数)的百分比。
- [0287] 2. 自动细胞计数:用荧光显微术对接触化合物后的少突胶质细胞分化程度进行定量。随机选择六个视野/孔来估计总群体中正分化的少突胶质细胞数目(细胞计数/孔为 ~ 8 到 15×10^3 个细胞)。利用装有连接到相同显微镜的 Zeiss AxioCam HRc 冷却的 CCD 照相机的 Zeiss AxioVision 数字成像系统获得了免疫荧光图像。设定了所有显微成像参数以获得图像来进行细胞免疫荧光强度分析。比较了对照和药物处理组的 MBP 阳性(分化的)细胞数对总细胞数(DAPI 核染色)的百分比。在成像条件下,未能检测到细胞自身荧光。
- [0288] 3. 人少突胶质细胞分化分析:人工计数每孔 O4 免疫阳性细胞总数(双极和多极)。
- [0289] 大鼠/小鼠/人定量聚合酶链式反应(PCR):评估化合物诱导的 PPAR- δ 途径活化以及少突胶质细胞成熟的程度(mRNA 水平的改变)

- [0290] 1. 利用 TriZol 试剂从培养的少突胶质细胞中提取了总 RNA。
- [0291] 2. 接着,用不含 RNase 的 DNase 处理 mRNA 并重新纯化,然后用 RT 反应 (Clontech Advantage RT for PCR Kit) 转化成 cDNA 模板。
- [0292] 3. 利用 Sybr Green PCR Master Mix 对 PPAR- δ 途径成员转录表达进行定量。
- [0293] 4. 利用悬浮在 Taqman 2X PCR Master Mix 中的 18S 核糖体 RNA 引物 / 探针混合物 (186bp 产物) 作为内部对照。
- [0294] 5. 利用实时 Taqman™ 技术 (Gibson, et al., 1996) 进行定量 PCR, 所用仪器为 7700 型序列检测系统 (model 7700SequenceDetectorSystem) (Applied Biosystems, FosterCity, CA)。
- [0295] 6. 结果用序列检测系统软件 1.91 版进行分析。
- [0296] 大鼠酶联免疫吸附测定 (ELISA):用以评估化合物诱导的 PPAR- δ 途径活化以及少突胶质细胞成熟的程度 (蛋白质水平的改变)
- [0297] 1. 分析板用 PBS 清洗,并保持在冰上。每孔加入 200 μ l 冰预冷的裂解缓冲液 (Tris 50mM, pH7.4, MgCl₂ 2mM, EDTA 1mM, β -巯基乙醇 5mM, Nonidet P-401%, 蛋白酶抑制剂混合液 (Roche):1 片 /50ml)。
- [0298] 2. 利用移液器上下吹打溶解细胞,将板在 4℃ 和 2000 转 / 分钟 (rpm) 条件下离心 5 分钟。上清液已经可以使用。
- [0299] 3. 移取 50 μ l 标准品、对照和样品到孔中。
- [0300] 4. 向每个孔中加入 50 μ l MBP 分析缓冲液。
- [0301] 5. 室温下温育孔,在轨道微平板摇动器上以 500-700rpm 摇动 2 小时。
- [0302] 6. 向每个孔中加入 100u1 MBP 抗体 - 生物素缀合物。
- [0303] 7. 于室温下温育孔,在轨道微平板摇动器上以 500-700rpm 摇动 1 小时。
- [0304] 8. 用清洗液洗孔 5 次。将培养板翻转放在吸水材料上吸干 (blot dry)。
- [0305] 9. 用 MBP Elisa 测定缓冲液将链霉抗生物素蛋白 - 酶缀合物浓度按 1 : 50 稀释。(必须在分析中现稀释现用)。
- [0306] 10. 向每孔中加入 100 μ l 链霉抗生物素蛋白 - 酶缀合物。
- [0307] 11. 室温下温育孔,在轨道微平板摇动器上以 500-700rpm 摇动 30 分钟。
- [0308] 12. 用清洗液洗孔 5 次。将培养板翻转放在吸水材料上吸干。
- [0309] 13. 向每个孔中加入 100 μ l TMB 色原体溶液 (ChromogenSolution)。
- [0310] 14. 室温下温育孔,在轨道微平板摇动器上以 500-700rpm 摇动 10-20 分钟。避免直接暴露在太阳光下。
- [0311] 15. 向每个孔中加入 100 μ l 反应终止液 (StoppingSolution)。
- [0312] 用微孔板读数器在 450nm 下读出 30 分钟内孔中溶液的吸收。
- [0313] 概念模型的体内证据
- [0314] 灶性损伤:(用来评估化合物是否保护髓鞘质的完整性或加速 / 促进再髓鞘化的速度。)
- [0315] 1. 在用于实验之前,让 7 周龄的大鼠随意摄取食物和水,并适应最少 4 天。
- [0316] 2. 手术前,将每个动物称重。然后用 1.8 : 1 的氯胺酮 (100mg/ml): 甲苯噻嗪 (20mg/ml) 溶液麻醉大鼠。手术步骤前,用上述麻醉液按 0.15ml/180g 体重腹膜内注射大

鼠。按照 IACUC 的指南,使用无菌条件对大鼠进行手术准备。所有手术器具均高压灭菌。剪去两耳之间的毛,然后用聚维酮碘擦洗这一区域,并用无菌盐水冲洗,最后用预先包装的无菌酒精棉签擦拭。

[0317] 3. 手术步骤中,大鼠的腹部表面放在一个小的动物立体定位仪上,以便保持头部固定不动。门齿杆始终设置在 -3.9mm,因为这一设定已证明能够使 SD 大鼠的颅骨处于平直位置。

[0318] 4. 在预先剃去毛的颅骨上两耳之间的皮肤上切一切口。

[0319] 5. 在 AP-1.8, ML-3.1 (从 lambda) 坐标处的骨头上钻一小孔 (直径 0.75mm)。

[0320] 6. 除去骨头,然后用哈密顿 (Hamilton) 微升注射器和针头在 2 分钟内在大鼠的右小脑小尾侧脚 DV-7.1mm 处注入 2 μ l 溴化乙锭、溶血卵磷脂或 SIN-1。备选地,也可注射到脊髓、胼胝体或皮质中。

[0321] 7. 其后 2 分钟,针头保留在原位。

[0322] 8. 取出针头后,将切口缝合。

[0323] 9. 在每只大鼠的一只后腿上肌肉注射 0.003mg 丁丙诺啡。

[0324] 10. 将大鼠放在温暖的橱柜中,直到苏醒过来。这时候,则将大鼠放回其原来的笼子里。每个笼子里不要放超过两只大鼠,因它们会把彼此的缝合线拉出来。

[0325] 11. 也用小鼠进行了类似的步骤。

[0326] 大鼠实验性变应性脑脊髓炎 (Rat EAE) 疾病模型:

[0327] 实验性变应性脑脊髓炎 (EAE) 是 T- 细胞介导的神经系统自体免疫疾病,在易患动物中,经过全脊髓匀浆物或一种组分 (髓鞘碱性蛋白) 的致敏,可形成此种疾病。EAE 啮齿类模型对于在 MS 患者中观察到的大脑和脊髓炎症的研究是很适当的工具。在啮齿动物中,注射全脊髓或脊髓组分,如髓鞘碱性蛋白可引起基于 T- 淋巴细胞活化的自体免疫反应。在接种后 8-10 天,临床疾病通常变得明显,观察到的广泛行为异常包括轻微步态异常、尾巴弛缓到完全瘫痪和死亡。典型情况下,会出现体重减轻。在活下来的动物中,出现自发恢复,并伴有多种运动功能不同程度的恢复。取决于物种、变应原以及所用的方法,EAE 模型测试的动物可以经历一次 (急性 EAE) 或几次 (慢性复发 EAE) 发作。有几种治疗方法可采用:所选药物或治疗可在免疫前、无症状期期间或临床疾病期间施用。

[0328] 动物:

[0329] 雌性 Lewis 大鼠,160-220g(Charles River)

[0330] 抗原:

[0331] 豚鼠全脊髓 (Harlan Biosciences)。

[0332] 弗氏完全佐剂 H37Ra [1mg/ml 结核分支杆菌 H37Ra] (Difco)。

[0333] 其他抗原:

[0334] 结核分支杆菌 (Difco)。

[0335] 百日咳博德特氏菌 [加热杀灭] (Difco)。

[0336] 抗原制备: (供大约 720 只动物用):

[0337] 1. 称取 5 克冷冻豚鼠脊髓。

[0338] 2. 加入 5 克脊髓到一个圆底离心管中的 5ml 0.9% 盐水 (1g/ml) 中。

[0339] 3. 在冰上用 Tissue-tech 匀浆,直到组织完全破坏 (大约 5 分钟)。

[0340] 4. 加入 10ml 补充有 200mg 结核分支杆菌的弗氏完全佐剂 H37Ra (20mg/ml 弗氏完全佐剂 H37Ra)。

[0341] 5. 用装有 18 号乳化针头的 10ml 注射器将匀浆 / 佐剂从管中吸出。

[0342] 6. 在两个 30ml 玻璃注射器之间进行乳化,直到材料难以继续通过针头为止。(大约 5 分钟 {不得出现油相和水相分离})。

[0343] 7. 立即使用或保持在冰上待用 (不超过 30 分钟) (不要冷冻)。

[0344] 方案

[0345] 1. 在用于实验之前,让雌性 Lewis 大鼠 (Charles River) 自由摄取食物和水,至少要适应 3 天。

[0346] 2. 体重为 160 和 220 克的大鼠最初用 5% 异氟烷 (Aerrane, Fort Dodge)、30% O₂、70% N₂O 诱导 2-5 分钟。

[0347] 3. 大鼠然后被放到循环水加热毯上 (Gaymar) (脊背朝上),并放到鼻锥体 (noseCone) 中自发呼吸麻醉气体。异氟烷降到 2%。

[0348] 4. 在后爪的腹侧面两次皮下注射 (每次 0.1ml) 抗原或生理盐水。

[0349] 5. 从鼻锥体中取出大鼠,称重并编号。

[0350] 6. 让大鼠从麻醉中醒来并放到单独的笼子里。

[0351] 7. 每天观察大鼠,看有无 EAE 诱导的迹象 (见下面的标准)。

[0352] 0 期 正常

[0353] 1 期 异常步态和尾巴弛缓

[0354] 2 期 一条或两条后腿轻微但确定的虚弱

[0355] 3 期 一条或两条后腿严重虚弱或轻度共济失调

[0356] 4 期 严重下肢轻瘫,后腿很少活动

[0357] 5 期 后腿不动并且下身麻痹

[0358] 6 期 无自发活动的濒死状态,呼吸受阻。

[0359] 也可以发生更大的程度前腿累及,和大小便失禁

[0360] 7 期 死亡

[0361] 免疫后第 10 天开始治疗。由于这一模型的疾病症状典型情况下是在接种后 10-11 天出现,这一时间点可被认为是代表 MS 急性发作的初始阶段。我们的判断是,这种延迟治疗比传统的治疗方案在接种时、甚至接种前给药更接近地模拟了临床情况 (Teitelbaum D. et al., Proc Natl AcadSci USA1999 ;96 :3842-3847 和 BrodS. A., et al., Ann Neurol 2000 ;47 :127-131)。

[0362] 下面的本发明化合物实施例进一步例示了本发明,这里提供这些实施例仅仅是为了阐明的目的,它们绝不以任何方式限制本发明的范围。

[0363] 合成实施例

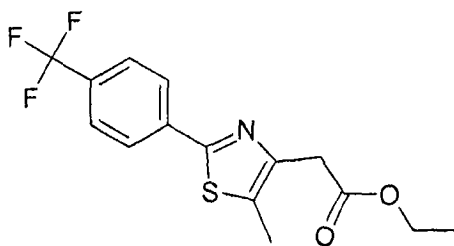
[0364] 概述

[0365] 商业试剂和溶剂直接使用。¹H NMR 谱是用 VarianMercuryPlus-300 (300MHz) 或 Varian Unity Inova (400MHz) 分光计记录的,如所示。质子化学位移以相对于内部四甲基硅烷 (0.0ppm) 的 δ ppm 报告的。利用具有电喷射离子化的飞行质谱仪的 Micromass LCT 时间和 m/z100 到 1000 的 5 分钟数据获取时间得到 MS (LC-MS) 数据。LC (LC-MS) 实

验采用 HypersilC18 柱 (4.6×50mm, 3.5 μ m, 移动相为 0.1% TFA 水溶液 (A) 和 0.1% TFA 的 ACN 溶液 (B), 前 3 分钟梯度为 5% 到 100% B, 接着 2 分钟为 100% B。备选地, 可将带有电喷射源的 Platform LC-MS 与 HP1100LC 系统结合使用, LC 系统的运行参数为 2.0ml/min, 200 μ L/min 分流至质谱仪的电喷离子源, LC 检测为联机 HP1100 DAD 检测和 SEDEX ELS 检测。采用了 LunaC18(2) 柱 (30×4.6mm 3 μ m, 移动相为 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸的 ACN 溶液 (B), 4.5 分钟内梯度为 5% 到 95% B。HPLC 纯化在 Varian ProStar 系统上进行, 采用反相 C18 柱和含有 0.1% 三氟乙酸的 ACN/ 水线性梯度。微波合成采用 PersonalChemistrySmithcreator 微波反应系统进行, 反应容器为 2 或 5mL。

[0366] 实施例 1

[0367]



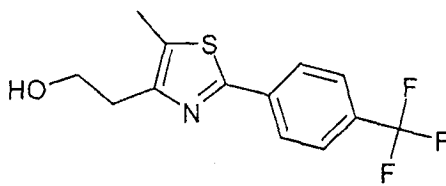
[0368] 中间体: [5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基]-乙酸乙酯

[0369] 向 4-三氟甲基-苯-硫代酰胺 (1.845g, 9mmol) 在乙醇 (15mL, 无水) 中的溶液, 加入乙基-4-溴-3-氧-戊酸酯 (2.07g, 9mmol)。密封并在 PersonalChemistry™ 微波炉中加热该溶液到 170°C, 并在此温度搅拌 20 分钟。让得到的溶液冷却到室温, 减压浓缩, 并用急骤层析纯化残余物 (用 30% 乙酸乙酯/10% 二氯甲烷的庚烷溶液洗脱), 得到标题化合物为白色固体 (1.4g)。

[0370] MS (ESI) m/z 330 (M+H); ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.87 (bs, 1H), 2.49 (s, 3H), 4.86 (s, 2H), 7.67 (d, $J = 8\text{Hz}$, 2H), 8.02 (d, $J = 8\text{Hz}$, 2H)。

[0371] 实施例 2

[0372]



[0373] 中间体: 4-(2-羟基-乙基)-5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑

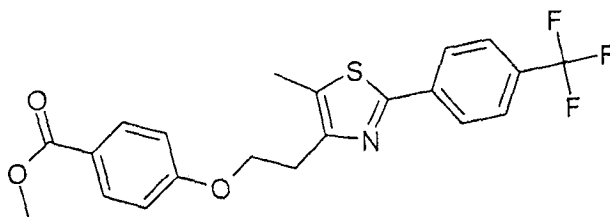
[0374] 冷却 (0°C) 氢化铝锂溶液 (5.3mL, 1M THF 溶液) 并加入 [5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基]-乙酸乙酯 (实施例 1, 1.4g, 4.25mmol) 的 THF 溶液 (15mL)。溶液加完后, 移走冷浴并搅动 2 小时。将这一溶液冷却到 5°C, 然后滴加水 (0.2mL), 再加入 NaOH 溶液 (0.2mL, 5M 水溶液) 和水 (0.2mL)。用乙酸乙酯稀释得到的混合物, 然后用硅藻土滤片过滤。用二氯甲烷洗涤固体, 然后在减压条件下浓缩合并的滤液。用急骤层析纯化残余物 (用 30% 乙酸乙酯 40% 二氯甲烷的庚烷溶液洗脱), 得到标题化合物为黄色固体 (0.879g)。利用实施例 1 中的化合物作为起始材料以获得该标题化合物。

[0375] MS (ESI) m/z 288 (M+H); ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.44 (s, 3H), 2.91 (t, $J = 7\text{Hz}$, 2H), 3.62 (t, $J = 6\text{Hz}$, 1H), 4.01 (dt, $J = 7, 6\text{Hz}$, 2H), 7.66 (d, $J = 8\text{Hz}$, 2H), 7.96 (d, $J = 8\text{Hz}$,

2H)。

[0376] 实施例 3

[0377]

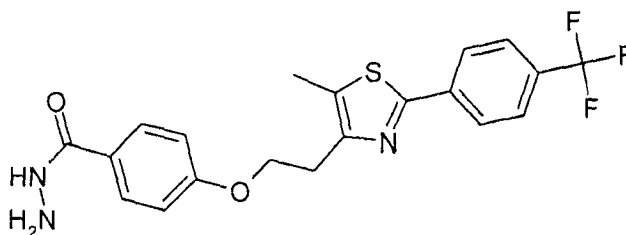


[0378] 中间体:4-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基乙氧基]-苯甲酸甲酯

[0379] 向 4-(2-羟基-乙基)-5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)噻唑 (实施例 3, 288mg, 1.0mmol) 的 THF (3mL) 溶液中, 加入 4-羟基-苯甲酸甲酯 (167mg, 1.1mmol), 接着加入三苯基膦 (288mg, 1.1mmol)。向这一溶液中, 滴加偶氮二甲酸二乙酯 (174 μ L, 1.1mmol)。滴加完毕后, 搅动得到的红色溶液 20 分钟, 减压浓缩并用急骤层析纯化残余物 (用 15% 乙酸乙酯 / 15% 二氯甲烷的庚烷溶液洗脱), 得到标题化合物为白色固体 (410mg)。MS (ESI) m/z 422 (M+H); 1H NMR (DMSO) δ 2.51 (s, 3H), 3.19 (t, J = 7Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.40 (t, J = 7Hz, 2H), 7.05 (d, J = 9Hz, 2H), 7.83 (d, J = 8Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8Hz, 2H) 8.05 (d, J = 8Hz, 2H)。

[0380] 实施例 4

[0381]



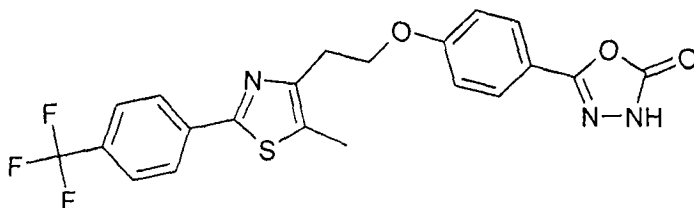
[0382] 中间体:4-[2-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基]-乙基]-苯甲酰胺

[0383] 向 4-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基乙氧基]-苯甲酸甲酯 (实施例 4, 410mg, 1mmol) 在甲醇 (10mL) 的悬浮液中, 加入无水酰肼 (0.32mL, 10mmol)。将所得混合物在 60°C 保温, 并在此温度搅拌 66 小时。将所得溶液冷却到室温, 并加入 3 滴水。过滤沉淀并用醚洗涤, 得到标题化合物 (279mg)。

[0384] MS (ESI) m/z 422 (M+H); 1H NMR (DMSO) δ 2.51 (s, 3H), 3.17 (t, J = 7Hz, 2H), 4.36 (t, J = 7Hz, 2H), 4.38 (bs, 2H), 6.98 (d, J = 9Hz, 2H), 7.77 (d, J = 9Hz, 2H), 7.83 (d, J = 8Hz, 2H) 8.06 (d, J = 8Hz, 2H) 9.58 (bs, 1H)。

[0385] 实施例 5

[0386]



[0387] 5-(4-{2-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基]乙氧基}苯基)-3H-[1,3,4]噁二唑-2-酮

[0388] 向 4-{2-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噻唑-4-基]乙氧基}-苯甲酸酰肼(实施例 4, 276mg, 0.65mmol) 在二氯甲烷 (4mL) 的悬浮液中, 加入吡啶 (104 μ L, 1.3mmol), 接着再加入氯甲酸苯酯 (0.88 μ L, 0.71mmol)。在室温下搅动得到的混合物, 直至所有的起始材料被消耗完毕 (TLC 分析)。用乙酸乙酯稀释混合物, 先用水, 然后再用盐水洗涤, 在 MgSO_4 上干燥, 并在减压条件下浓缩。用乙腈 (5mL) 吸收残余物。向这一混合物中, 加入 DBU (106 μ L, 0.71mmol)。密封得到的溶液; 在 Personal Chemistry™ 微波炉中加热到 170°C 并在此温度下搅拌 120 分钟。将反应物冷却到室温, 用乙酸乙酯稀释, 再用 1M HCl 溶液 (或饱和 NaH_2PO_4 溶液) 洗涤, 在 MgSO_4 上干燥, 并浓缩。将所得的残余物用二氯甲烷研磨几次, 得到标题化合物为棕褐色固体 (137mg)。(在 140°C 下, 在密封的试管中从乙酸乙酯中重结晶)。

[0389] MS(ESI) m/z 448 (M+H); ^1H NMR (DMSO) δ 2.51 (s, 3H), 3.19 (t, J = 7Hz, 2H), 4.40 (t, J = 7Hz, 2H), 7.10 (d, J = 8Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8Hz, 2H), 7.83 (d, J = 8Hz, 2H) 8.05 (d, J = 8Hz, 2H) 12.41 (bs, 1H)。